



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



TESIS DOCTORAL

Actividad citotóxica del éter-lípido
edelfosina en células de cáncer de
hígado.

Reyna Alejandra Jiménez Flores

Director de tesis:
Faustino Mollinedo García

CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA – CSIC
SALAMANCA 2015

El Dr. **Faustino Mollinedo García**, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y miembro del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que la memoria de tesis titulada **“Actividad citotóxica del éter-lípido edelfosina en células de cáncer de hígado”** presentado por Dña. **Reyna Alejandra Jiménez Flores**, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca, a 16 de noviembre de 2015.

Dr. Faustino Mollinedo García
Director de la tesis

A mis padres y a mi hermana

A Paula y a David

FIDES

No te resignes antes de perder
definitiva, irrevocablemente
La batalla que libras.
Lucha erguido y sin contar las enemigas huestes.
¡Mientras veas resquicios de esperanza, no te rindas!.
La suerte gusta de acumular los imposibles
para vencerlos en conjunto, siempre,
con el fatal y misterioso golpe de su masa de Hércules....
¿Sabes tu si el instante en que, ya fatigado,
desesperes, es justo aquel
que a la definitiva realización de tu ideal precede?.
Quien alienta una fe tenaz,
al hado más torvo compromete en su favor.
El sino a la fe solo es vulnerable y resistir no puede.
La fe otorga el divino privilegio de la casualidad
a quien la tiene en grado heroico.
Cuando las tinieblas y los espectros y los trasgos,
lleguen a inspirarte pavor, cierra los ojos,
embraza tu fe toda y arremete.
¡Verás como los monstruos más horribles
al embestirlos tu, se desvanecen!.
Cuanto se opone a los designios puros del hombre,
es irreal, tan solo tiene la imaginaria vida
que le dan nuestro miedo y nuestra fiebre.
Dios quiso en su bondad que los obstáculos
para aguzar las armas nos sirviesen;
quiso que el imposible estuviese nomas para vencerle,
¡Como está la barrera en los hipódromos,
a fin de que la salten los corceles!.
¡Búrlate, pues de cuanto en el camino
tu altivo impulso detener pretende!
¡No cedas ni a los hombres ni a los ángeles!
(Con un ángel luchó Jacob, inerme,
por el espacio entero de una noche,
....y el ángel le bendijo, complaciéndose
en la suprema audacia del mancebo,
a quien llamó Israel, porque era fuerte contra todos....)
¡Ama mucho, que el que ama,
embota hasta los aguijones de la muerte!.
Que tu fe trace un círculo de fuego
entre tu alma y los monstruos que la cerquen. Y si es mucho el horror de los
fantasmas que ves, cierra los ojos y arremete!

AMADO NERVO (Poeta mexicano)

INDICE DE CONTENIDO.

PÁG.

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	1
1. Cáncer.....	1
1.1 Definición	1
2. Cáncer de hígado.....	3
2.1 Epidemiología del cáncer hepático	4
2.2 Factores de riesgo	7
2.2.1 Genética y origen étnico.....	7
2.2.2 Edad.....	7
2.2.3 Género.....	8
2.2.4 Infecciones virales crónicas	8
2.2.5 Carcinógenicos químicos	8
2.2.6 Tabaquismo y consumo del alcohol	9
2.3 Bases moleculares y genéticas del cáncer de hígado.....	10
2.3.1 Alteraciones del gen TP53	12
2.3.2 Alteraciones genéticas que activa la vía de WNT/ β catenina	13
2.3.3 Alteraciones en los genes de Retinoblastoma y P16 ^{INK4}	13
2.3.4 Alteraciones genéticas e infección por HBV	14
2.4 Origen del cáncer Hepático.....	14
2.4.1 Hepatocitos como origen del cáncer hepático.....	17
2.4.2 El origen del cáncer hepático a través de células stem y progenitoras	17
2.5 Diagnóstico.....	20
2.5.1 Clasificación del tumor hepático	21
2.6 Terapia contra el cáncer hepático.....	24
2.6.1 Resección quirúrgica	24
2.6.2 Terapia ablativa local.....	25
2.6.2.1 Inyección percutánea de etanol.....	25
2.6.2.2 Ablación por radiofrecuencia.....	26
2.6.2.3 Crioblación	26
2.6.3 Quimioembolización transarterial.....	26
2.6.4 Trasplante hepático.....	27
2.6.5 Quimioterapia sistémica.....	27
2.6.6 Terapias moleculares dirigidas	28
2.6.6.1 Sorafenib.....	28
2.6.6.2 Otras terapias dirigidas	28
3. Hipoxia y el factor inducible por hipoxia (HIF)	28
3.1 Resistencia a fármacos mediada por hipoxia	31
3.2 El papel de los HIFs en la biología tumoral	31
4. Muerte celular	32
4.1 Muerte celular programada	32

4.1.1 Apoptosis	33
4.1.1.1 vías de señalización de apoptosis.....	33
4.1.2 Autofagia.....	35
4.1.3 Necrosis y Necroptosis.....	36
5. Lípidos antitumorales (ATLs).....	38
5.1. Historia, origen y estructura.....	38
5.2 Mecanismos de acción de los ATLs y vías de señalización implicadas	39
5.2.1 Efecto sobre el metabolismo lipídico.....	39
5.2.2 Estrés en el retículo endoplásmico	39
5.2.3 Efecto de ATLs sobre las vías de señalización	39
Capítulo 2. OBJETIVOS	41
Capítulo 3. MATERIALES Y METODOS	43
3.1 MATERIALES	43
3.1.1 Líneas celulares.....	43
3.1.2 Cultivos celulares	43
3.1.3 Lípidos antitumorales evaluados	44
3.1.4 Anticuerpos.....	44
3.2 METODOS	46
3.2.1 Cultivos celulares	46
3.2.1.1 Preparación de solución Stock de edelfosina.....	46
3.2.1.2 Criopreservación de líneas celulares	46
3.2.1.3Pretratamientos con los distintos inhibidores	46
3.2.2 Cultivos celulares en condiciones de hipoxia.....	47
3.2.3 Cultivo de líneas celulares y análisis de la actividad apoptotica de la edelfosina	47
3.2.4 Análisis de apoptosis y ciclo celular mediante citometría de flujo	47
3.2.5 Permeabilización de la membrana plasmática por incorporación de yoduro de propidio.....	48
3.2.6 Análisis de calcio citoplasmático por medición de Fluorescencia (fluor-4)	48
3.2.7 Analisis de liberacion de citocromo c mitocondrial	48
3.2.8 Medición del potencial de membrana mitocondrial y Producción de especies reactivas de oxígeno.....	49
3.2.9 Western blot e inmunodetección	49
3.2.10 Formación de hepatoesferas	50
3.2.11 Disgregación de hepatoesferas.....	51
3.2.12 Ensayo de clonogenicidad (formación de colonias de células stem en agar)	51
3.2.13 Inmunocitoquímica.....	52
3.2.14 Ensayo anexina V/yoduro de propidio.....	53
3.2.15 Extracción de RNA.....	53

3.2.16 Diseño del microarray	53
3.2.17 Análisis bioinformático	53

Capítulo 4: RESULTADOS 55

Sección 1: Caracterización de la muerte celular

4.1 Análisis apoptótico de las líneas de cáncer de Hígado mediante ciclo celular generada por el compuesto EDLF y otros ATLs.....	55
4.2 Implicación de las caspasas en la ruta de apoptosis en líneas de cáncer de hígado	57
4.3 Evaluación de rutas de Muerte Alternativas a la apoptosis Generada por EDLF en líneas de cáncer de Hígado	59
4.3.1 Autofagia	61
4.4 Implicación del calcio en la muerte por apoptosis en el Tratamiento con EDLF	64
4.5 Efecto de la edelfosina sobre el estrés de retículo endoplásmico en células de cáncer de hígado.....	65
4.6 Participación de la mitocondria en la muerte celular inducida por edelfosina	66
4.6.1 Liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol ..	67
4.6.2 Estudio del papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y cambios en el potencial de Membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	69
4.6.3 Efecto del antioxidante N-acetil-cisteína (NAC) sobre la muerte inducida por EDLF	71
4.7 Efecto de la edelfosina sobre la vía de señalización de las MAPK en el tratamientode células de cáncer de hígado	72
4.7.1 Activación de JNK	72
4.7.2 Activación de ERK 1/2.....	73
4.8 Efecto de la edelfosina sobre la ruta de PI3K/AKT en líneas Celulares de cáncer de hígado	75
4.9 Estudio de la expresión de HIF-1 α como principal marcador de Hipoxia en líneas celulares de cáncer hepático	77
4.10 La hipoxia no altera el efecto apoptótico de la Edelfosina	78
4.11 Formación de hepatoesferas o cultivos 3D	80
4.12 La edelfosina Inhibe la formación de esferas en agar (Ensayo de clonogenicidad)	83
4.13 La edelfosina induce muerte por apoptosis en hepatoesferas de la línea celular PLC/PRF/5	83
4.14 Análisis diferencial de expresión génica entre hepatoesferas vs. línea celular parental PLC/PRF/5	84

Capítulo 5: DISCUSION	103
5.1 Caracterización de la muerte celular en líneas de cáncer de hígado. La edelfosina induce distintos tipos de muerte celular en líneas de cáncer Hepático.....	103
5.2 Necrosis y autofagia	104
5.3 Papel del calcio intracelular y del estrés del retículo endoplásmico en la inducción de muerte celular por edelfosina en células de cáncer de hígado	105
5.4 La activación de la vía mitocondrial, mediada por caspasa 9, se ve favorecida por la pérdida de potencial de membrana mitocondrial y el aumento de ROS.....	107
5.5 Las MAPKs participan en los mecanismos de muerte generada por edelfosina en líneas de cáncer de hepático.....	108
5.6 La acción proapoptótica de la edelfosina y la vía oncogénica PI3K/AKT/mTOR	110
5.7 Hipoxia y muerte celular	111
5.8 La hipoxia no altera el efecto apoptotico de la edelfosina en células HeLa	112
5.9 Hipoxia y resistencia a edelfosina en líneas de cáncer de hígado	113
5.10 Células stem cancerosas	114
5.11 La línea celular PLC/PRF/5 contiene un porcentaje elevado de SP (side population) y es capaz de formar hepatoesferas	114
5.12 La edelfosina inhibe el potencial clonogénico <i>in vitro</i> de la SP en agar	115
5.13 La edelfosina induce muerte por apoptosis en la SP	116
5.14 Identificación de genes regulados diferencialmente en la SP de la línea celular PLC/PRF/5	116
Capítulo 6. CONCLUSIONES.....	119
Capítulo 7. BIBLIOGRAFÍA	121
AGRADECIMIENTOS	141

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

1.1 Definición

La palabra cáncer se emplea para definir una enfermedad en la cuál células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos. El cáncer no es una única enfermedad, sino que abarca una gran diversidad de enfermedades que pueden presentarse en cualquier sistema de órganos. En medicina, el término cáncer se utiliza para identificar una entidad clínica y anatomopatológica de carácter maligno que afecta a un paciente, cuyas características histopatológicas son la alteración morfológica y funcional seguida de la proliferación descontrolada de las células de un tejido que invaden, desplazan y destruyen, localmente y a distancia, otros tejidos sanos del organismo, proceso que ocurre en una escala temporal de meses o años. Los tumores son masas celulares formadas por clones de células que han perdido los controles que regulan su multiplicación celular, y se dividen según su composición en tumores benignos y malignos. Los tumores benignos están formados por células que son parecidas a las normales y pueden funcionar como éstas, y además suelen estar muy localizados allí donde se originan.

Los tumores malignos en cambio, se componen de células menos diferenciadas y tienen propiedades invasivas y de propagación: es decir, invaden tejidos adyacentes y establecen áreas de proliferación lejos de su lugar de origen. Los tumores malignos se clasifican según la procedencia de la célula originaria transformada, en dos tipos según su origen: tumores epiteliales y mesenquimales. Los tumores epiteliales, tanto de origen ectodérmico como endodérmico, son los carcinomas. Son cánceres que surgen en láminas de epitelios que recubren superficies. Por otro lado, se encuentran los sarcomas, las leucemias y los linfomas, que son tumores de estirpe mesenquimal. Los sarcomas son tumores sólidos, y las leucemias y los linfomas se incluyen dentro de los tumores hematopoyéticos.

Los efectos del cáncer conforman un conjunto de signos y síntomas de pronóstico y tratamiento diferentes, que depende de la localización anatómica en la que se encuentre y del tipo celular o histológico del que proceda, principalmente. Tras un cuarto de siglo de rápidos avances, la investigación sobre el cáncer ha generado un complejo conjunto de conocimientos que revelan que estamos ante una enfermedad que implica cambios dinámicos en el genoma. Las bases de este conocimiento se asientan en el descubrimiento de

mutaciones que producen la activación dominante de oncogenes y/o la pérdida de función recesiva de genes supresores de tumores [1, 2]. Ambos tipos de genes han sido identificados a través de sus alteraciones tanto en células cancerígenas humanas como animales y mediante su implicación en el fenotipo tumoral de modelos experimentales [3]. El proceso canceroso, llamado tumorigénesis, es un proceso que incluye múltiples etapas durante las cuales se acumulan varias alteraciones genéticas y epigenéticas en el DNA para producir un fenotipo maligno completo. Es un proceso clonal que se origina en una primera y única célula que, por una o varias mutaciones iniciales, escapa a los controles normales de proliferación y diferenciación, lo que le confiere una ventaja en su crecimiento sobre las demás células. Los cambios genéticos incluyen mutaciones o deleciones puntuales, amplificaciones y translocaciones cromosómicas. Sin embargo, las alteraciones epigenéticas incluyen tres tipos diferentes de cambios: metilación del DNA, modificaciones de histonas y cambios en el imprinting genético [4]. La hipótesis más aceptada sobre el origen del cáncer se basa en que las células cancerígenas adquieren diversas propiedades durante el desarrollo, tales como: independencia de los factores de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento, inhibición de la apoptosis, potencial de replicación ilimitado, estimulación de la angiogénesis, capacidad de invadir tejidos y metastasis [3]. En años recientes, gracias a los avances en los estudios sobre el cáncer y los conceptos adquiridos, se ha visto que la reprogramación del metabolismo energético y el evadir la destrucción inmunitaria, son dos características que también son de potencial importancia [5]. Independientemente de la causa inicial, para que una célula normal se convierta en cancerosa y transmita a sus descendientes las características tumorales, el cambio tiene que estar marcado de algún modo en su material genético. Esto implica que, si bien los agentes desencadenantes de cáncer pueden ser múltiples, todos ellos actúan sobre un sustrato genético común dentro de la célula. De esta manera, está ampliamente aceptado que el cáncer es una enfermedad genética y clonal que se inicia en una única célula cuya descendencia da lugar al tumor.

En la actualidad, se han obtenido numerosos avances en investigación sobre el cáncer, debido a que las aproximaciones experimentales utilizadas a nivel técnico son innovadoras, ya que las tecnologías han evolucionado de manera acelerada de igual manera que los conceptos bajo los cuales actualmente se fundamentan los conocimientos sobre el cáncer.

2. Cáncer de Hígado

Aunque la patología neoplásica más frecuente a nivel hepático son las metástasis de tumores primarios de otro origen, los tumores hepáticos primarios representan una de las neoplasias malignas más comunes a nivel mundial. Aproximadamente la mitad de los tumores considerados hepáticos son de vesícula biliar, un tercio se sitúan en las vías biliares intra y extrahepáticas y el resto son carcinomas hepatocelulares primarios. En la tabla 1 se resumen las principales neoplasias hepáticas.

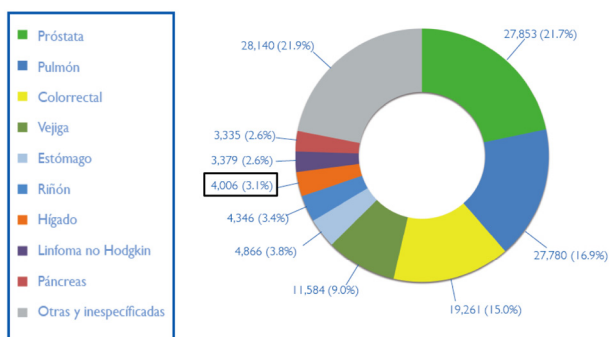
Tabla 1. Neoplasias hepáticas.

NEOPLASIAS HEPATICAS.
Tumores benignos
Hiperplasia hepatocelular: nódulos macroregenerativos, hiperplasia nodular, hamartoma mixto.
Adenoma hepatocelular: típico, asociado con esteroides anabolizantes
Quistes hepáticos: simples, hígado poliquístico
Adenoma del tracto biliar
Tumores mesenquimales benignos o lesiones pseudotumorales: hamartoma mesenquimal, hemangioma, hemangioendotelioma infantil, linfangiomatosis, lipoma, leiomioma, fibroma, pseudotumor inflamatorio, mixoma.
Tumores de tejido heterotópico o de origen incierto: tumor de restos adrenales, feocromocitoma, tumor de restos pancreáticos, carcinoides, tumor sinusoidal neuroendocrino infantil, teratoma, tumor trofoblástico maligno, tumor mixto hepático maligno
Tumores epiteliales malignos primarios
Variantes de carcinoma hepatocelular: juvenil, fibrolamelar, combinado, de células claras, de células gigantes, carcinosarcoma, hepatoblastoma esclerosante.
Colangiocarcinoma y carcinoma colangiocelular
Cistadenocarcinoma hepático, carcinoma de células escamosas
Tumores mesenquimales malignos primarios
Angiosarcoma, hemangioendotelioma, leiomiomasarcoma, schwannoma maligno, fibrosarcoma, histiocitoma, linfoma, osteosarcoma, rabdomiosarcoma, sarcoma mesenquimal.

2.1 Epidemiología del cáncer hepático

El carcinoma hepatocelular es un tumor muy frecuente en países asiáticos, donde las infecciones por virus hepatotropos y otros agentes cancerígenos para el hígado son más frecuentes. El carcinoma hepatocelular es de presentación universal, pero la incidencia tiene variaciones geográficas [6]. Son regiones de alta incidencia geográfica (entre 15 y 100 casos por 100.000 habitantes y año) el extremo oriente y el África subsahariana. Son regiones de mediana incidencia (entre 5 y 10 casos por 100.000 habitantes y año) los países del área mediterránea. Son regiones de baja incidencia (menos de 3-5 casos por 100.000 habitantes) el norte de Europa, Australia y América. Estas variaciones geográficas van en paralelo a factores raciales o genéticos y a factores ambientales. En aquellos países cuya incidencia va ligada al virus de la hepatitis C (HCV) la incidencia parece ir en aumento [7]. En España es relativamente importante: se diagnostican más de 3.000 casos anuales en nuestro país (14 por cada 100.000 hombres y 4 por cada 100.000 mujeres, anualmente)[8].

HOMBRES



MUJERES

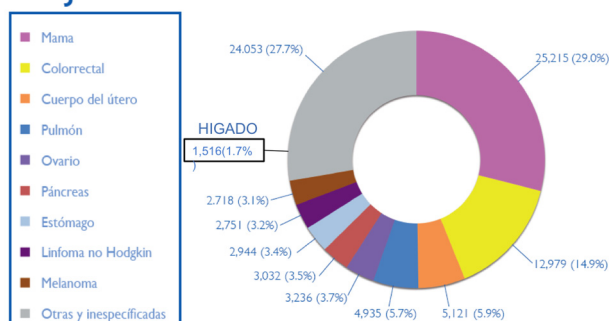


Figura 1. Incidencia de los tumores más frecuentes en Hombres y Mujeres en España. Imagen tomada del Informe de la Sociedad Española de Oncología Médica “Las cifras del cáncer en España 2014” [8].

Algunos marcadores tumorales séricos, en particular alfa-fetoproteína, también se han encontrado como marcadores pronósticos, sin embargo, se basan en la carga tumoral significativa, haciendo que su utilidad sea más eficiente en tumores operables [9]. Existen más marcadores los cuales se ha visto participan dentro del desarrollo de la hepatocarcinogénesis, algunos de ellos se encuentran resumidos en la tabla 2.

Tabla 2. Potenciales marcadores de valor pronóstico involucrados en la hepatocarcinogénesis.

Procesos involucrados en la hepatocarcinogénesis y marcadores asociados (*potencial valor pronóstico).	
1. Proliferación, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales que frenan el crecimiento	p53*, nm-23, Rb, PTEN*, c-met*, c-myc*, cyclin A, cyclin D, cyclin E, p15, p16, p18 p19, p21, p27, p57, TGF- β , Familia EGFR, índices de proliferación de factores de crecimiento.
2. Escape a la apoptosis	p53*, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak, Bcl-xS, survivina
3. Potencial replicativo ilimitado	Telomerasa (incluyendo TERT)*
4. Angiogénesis prolongada	MVD, VEGF*, HIF-1 α , NOS, bFGF, PD-EGF, tissue factor, endostatin/collagen XVIII, interleukin-8, angiopoietin
5. Invasión de tejidos y metástasis	MMPs*, uPA, cadherin/catenin complex
6. Inestabilidad genómica	Inestabilidad cromosómica, aneuploidia*, inestabilidad de microsatélites
nm-23, proteína no metastática-23; Rb, gen del Retinoblastoma; PTEN, homólogo de la tensina y la fosfatasa; TGF- β , factor de crecimiento transformante β ; EGFR family, familia del receptor de crecimiento epidérmico; TGF- α , factor de crecimiento transformante α ; HB-EGF, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina; TERT, transcriptasa reversa de la telomerasa; MVD, densidad de los microvasos; VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular,; HIF-1 α , factor inducible por hipoxia 1 α ; NOS, óxido nítrico sintasa; bFGF, factor de crecimiento básico de fibroblastos; PD-EGF, factor de crecimiento del endotelio derivado de plaquetas; MMP, metaloproteasas de la matriz; uPA activador de plasminógeno urokinasa.	

En más del 70% de los casos el hepatocarcinoma se diagnostica como una enfermedad irresecable o en estadio avanzado, y por tanto, con un pronóstico muy pobre [10]. Según la Asociación Española Contra el Cáncer, en colaboración con la Sociedad Española de Oncología Médica, datos publicados en “las Cifras del Cáncer en España 2014” La tasa de supervivencia sin tratamiento al año es del 29%, a los 2 años del 18% y a los 3 años sólo el 8% [8]. Cuando la cirugía

puede ser completa, en el estadio inicial, la supervivencia a los 5 años es mayor del 50%, pero existe un riesgo de recurrencia tras la cirugía superior al 70% a los 5 años. En los tumores irresecables que se tratan con técnicas locales la supervivencia a los 5 años puede llegar al 50% solo en los sujetos con función hepática buena. Sin embargo, la tasa de recurrencia a los 5 años oscila entre el 80 y el 100%. Los tumores más avanzados tienen una supervivencia media corta, que no supera el año.

Tabla 3. Estimación sobre incidencia, Mortalidad y prevalencia a 5 años en hombres y mujeres de los tumores más frecuentes. Sociedad Española de Oncología Médica Las cifras del cáncer en España 2014, [7, 11].

Cáncer	Incidencia			Mortalidad			Prevalencia a 5 años		
	Número	(%)	ASR (W)	Número	(%)	ASR (W)	Número	(%)	ASR (W)
Labio y cavidad oral	4098	1.9	4.7	1117	1.1	1.2	11811	2.0	29.8
Nasofaringe	350	0.2	0.5	188	0.2	0.2	909	0.2	2.3
Otros faringeos	1530	0.7	2.1	765	0.7	1.0	3792	0.7	9.6
Esófago	2090	1.0	2.5	1728	1.7	1.9	2238	0.4	5.7
Estómago	7810	3.6	7.8	5389	5.2	4.9	12611	2.2	31.8
Colorrectal	32240	15.0	33.1	14700	14.3	12.3	89705	15.4	226.3
Hígado	5522	2.6	5.9	4536	4.4	4.3	5506	0.9	13.8
Vesícula biliar	2002	0.9	1.7	1174	1.1	0.9	1905	0.3	4.8
Páncreas	6367	3.0	6.3	5720	5.6	5.5	3437	0.6	8.7
Laringe	3182	1.5	4.1	1321	1.3	1.5	11200	1.9	28.3

Globalmente, el cáncer de hígado representa un problema de salud, con más de un millón de casos diagnosticados cada año en todo el mundo.

Las estimaciones de la Sociedad Americana contra el Cáncer para el cáncer primario de hígado y cáncer del conducto biliar intrahepático en los Estados Unidos para el 2015 son:

- Cerca de 35.660 casos nuevos (25.510 en hombres y 10.150 en mujeres) serán diagnosticados.
- Aproximadamente 24.550 personas (17.030 hombres y 7.520 mujeres) morirán de estos tipos de cáncer.

La Sociedad Americana contra el Cáncer también ha repordado que el porcentaje de estadounidenses que padecen cáncer de hígado ha aumentando lentamente durante varias décadas. La edad promedio al momento del diagnóstico de cáncer de hígado es de 63 años. Más del 95% de las personas diagnosticadas con cáncer de hígado tienen 45 años de edad o más. Alrededor

del 3% tiene entre 35 y 44 años de edad y aproximadamente el 2% son menores de 35 años.

El cáncer de hígado se ve con más frecuencia en hombres que en mujeres. El riesgo de un hombre medio de tener cáncer de hígado o cáncer del conducto biliar intrahepático es de 1 en 81, mientras que el riesgo de una mujer promedio es de 1 en 196. La mayoría de los casos ocurren en personas con ciertos factores de riesgo, como se describirá más adelante.

Este cáncer es mucho más común en África subsahariana y en el sureste de Asia que en los Estados Unidos. En muchos de estos países, el cáncer de hígado es el tipo más común de cáncer. Más de 700,000 personas son diagnosticadas con este cáncer cada año en el mundo. Además, el cáncer de hígado es una causa principal de muertes por cáncer a escala mundial, representando más de 600,000 muertes cada año.

2.2 Factores de riesgo

Podría considerarse que la patología hepática crónica es el principal factor de riesgo para el desarrollo de un carcinoma hepatocelular. Aunque también se han visto casos de hepatocarcinoma en pacientes sin factores de riesgo predictivos. En la tabla 4 se resumen algunos de los factores etiológicos del cáncer de hígado, así como el nivel de riesgo que representan para la enfermedad.

2.2.1 Genética y origen étnico

Existe una significativa variación en la incidencia del carcinoma hepatocelular entre grupos étnicos dentro del mismo país, las diferencias se explican en parte por perfiles distintos de factores de riesgo entre grupos étnicos. En Estados Unidos datos de entre 2006 y 2010 reportan que la incidencia más baja se dio en población blanca (4,2 de cada 100,000), seguido de los afroamericanos (7,5 de cada 100,000), luego hispanos (9,5 de cada 100,000) y finalmente asiáticos y de Islas del Pacífico (11,7 de cada 100,000) [12, 13].

2.2.2 Edad

La edad avanzada es un factor de riesgo muy observado en el desarrollo del cáncer hepático, al igual que en otros tipos de cáncer. La edad al momento del diagnóstico depende de los perfiles de la población y de los factores de riesgo.

Pacientes de zonas de alta incidencia en cáncer hepático tienden a ser más jóvenes que aquellos pacientes de las zonas de baja incidencia que presentan

una edad más elevada al momento de ser diagnosticados [14]. En algunos casos este fenómeno podría ser consecuencia de la edad a la cual la infección por virus como HBV y HCV fue adquirida. Los pacientes que han nacido en áreas de alta prevalencia de HBV presentan infecciones al momento de nacimiento o durante la infancia temprana, mientras que en lugares donde el HCV es el mayor factor de riesgo, la infección es adquirida durante el desarrollo de la vida diaria [15, 16].

2.2.3 Género

Existe un dimorfismo sexual muy claro en el carcinoma hepatocelular, los hombres en general presenta una mayor incidencia en cáncer hepático de 2 a 4 veces mayor que las mujeres.

Una explicación a este fenómeno podría deberse a la prevalencia en factores de riesgo como el tabaquismo, el abuso de alcohol entre los hombres, sin embargo aún contralando esas variables, la incidencia prevalece [15].

2.2.4 Infecciones virales crónicas

Existen varios estudios que han mostrado asociación entre los portadores de virus de la hepatitis B y un aumento en la incidencia de cáncer hepático. Millones de personas están infectas por HBV alrededor del mundo, y en más del 50% de los casos representa el factor de riesgo global determinante [17]. Otro factor predisponente para desarrollar hepatocarcinoma es la infección por virus de la hepatitis C (HCV). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) entre 130 y 150 millones de personas están infectadas por HCV en el mundo; la infección por HCV está involucrada en más del 25% de los casos de cáncer hepático y sobre todo es un factor de riesgo en países occidentales y en Japón [15, 17]. Estos pacientes se caracterizan por un desarrollo mucho más rápido del tumor, con una media de 30 años desde el momento de la infección por el virus. Presentan con frecuencia estadios avanzados de cirrosis en relación con la aparición del hepatocarcinoma. Aquellos pacientes que presenta una infección simultánea por HBV y HCV presentan un riesgo aún mayor [18].

2.2.5 Carcinogénicos químicos

La Aflatoxina es un metabolito de origen fúngico altamente carcinogénico, producido por la especie *Aspergillus Flavus* o *Aspergillus parasiticus*, este hongo puede contaminar y colonizar una gran variedad de alimentos básicos como el

maíz, trigo o arroz, particularmente en países en desarrollo y países con altas tasas de incidencia en HBV, como China, África Subsahariana, y el sureste de Asia [19, 20], donde se encuentran tierras ricas en humedad y temperatura. Tras los meses del monzon los cultivos de cereales aparecen cubiertos por una capa blanca, que se consume junto con el cereal en gran cantidad de poblaciones y es muy rica en Aflatoxina.

2.2.6 Tabaquismo y consumo de alcohol

El consumo de tabaco es factor de riesgo en el desarrollo de cáncer en humanos. En 2004 según la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) emitió datos en donde afirmó que de manera específica causa cáncer hepático.

La relación entre el consumo de alcohol y el cáncer hepático está claramente comprobada, a través de dos posibles mecanismos: como efecto toxico directo y como factor de riesgo para el desarrollo de cirrosis [21, 22].

Tabla 4. Etiología del Hepatocarcinoma. Tabla tomada de [23].

Etiología del hepatocarcinoma	
Patología	Riesgo
Cirrosis	
Virus de la hepatitis B	Alto
Virus de la hepatitis C	Alto
Alcohol	Alto
Hepatitis crónica autoinmune activa	Alto
Cirrosis criptogénica	Moderado
Cirrosis biliar primaria	Bajo
Patologías metabólicas	
Tirosinemia hereditaria	Alto
Déficit α 1- antitripsina	Alto
Ataxia telangectasia	Moderado
Glucogenosis tipo 1 y 3	Moderado
Galactosemia	Moderado
Telangiectasia hemorrágica hereditaria	Moderado
Porfiria cutánea tarda	Moderado
Enfermedad de Wilson	Moderado
Agentes ambientales	
Aflatoxina	Alto
Torotrast	Moderado
Esteroides anabolizantes	Moderado
Tabaco	***

2.3 Bases moleculares y genéticas del cáncer de hígado

Como bien se sabe, el cáncer es una enfermedad del DNA inherente a la acumulación de alteraciones genéticas y más específicamente de genes que controlan el ciclo y la proliferación celular, así como la regulación de la muerte celular. La gran mayoría de las alteraciones genéticas son comunes entre los diferentes tipos de tumores, sin embargo, la asociación de alteraciones genéticas recurrentes son muy específicas de cada tipo tumoral [24].

Los nódulos cirróticos displásicos, son considerados como precursores del carcinoma hepatocelular (HCC) [25, 26]. El desarrollo del HCC está altamente

asociado con la cirrosis y más del 90% de los tumores son encontrados en un cuadro de hepatitis crónica o con antecedentes de cirrosis [21, 22, 27].

Como se ha mencionado anteriormente, existen varios factores de riesgo que están asociados con el desarrollo de esas lesiones, los principales incluyen: infección con virus de la hepatitis B (HBV) o virus de la hepatitis C (HCV), fuerte ingesta de alcohol, y una prolongada exposición a la aflatoxina B1 (AFB1) o al cloruro de vinilo, así como una hemocromatosis primaria. Aproximadamente en el 90% de los casos de HCC al menos uno de los factores de riesgo es identificado, existiendo una variabilidad entre los pacientes de acuerdo a su origen geográfico. Sin embargo en menos del 10% de los casos, se ha observado un desarrollo del HCC en hígados no cirróticos y sin lesiones inflamatorias. En un estudio realizado por Edmonson y Henderson en 1976, se observó que alguno de estos casos podía corresponder a una transformación maligna de adenoma de hígado, que es un raro tumor hepatocelular benigno, con una alta incidencia en mujeres jóvenes que tuvieron tratamientos de anticoncepción oral en periodos de más de tres años [27].

La hepatocarcinogénesis está asociada con alteraciones genéticas y epigenéticas que eventualmente llevan a un crecimiento descontrolado de los hepatocitos. Rutas de señalización, oncogenes, factores de crecimiento y sus receptores son consideradas nuevas dianas terapéuticas potenciales en las terapias sistémicas dirigidas, limitando la extensión de la toxicidad sistémica [28]. En el cáncer primario de hígado las alteraciones más frecuentemente encontradas son conocidas porque ocurren en una serie de genes asociados al cáncer como TP53, WNT, CTNNB1 que codifica para β -catenina, así como genes relacionados con el ciclo celular como CCND1 que codifica para ciclina-D1 y CDKN2A (Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A) [29].

Algunos estudios han mostrado que los nódulos displásicos tempranos presentan un genoma relativamente uniforme con pequeñas variaciones genéticas, comparado con los tumores avanzados en los cuales existe una extensa heterogeneidad molecular e inestabilidad genómica [30-32].

Ocurren dos importantes eventos oncogénicos durante la hepatocarcinogénesis. La activación de MYC y TERT [30, 33-35]. MYC puede ser de particular importancia para la transformación maligna de los hepatocitos en el carcinoma hepatocelular, mientras que la activación de TERT es requerida para los procesos de proliferación ilimitada.

La progresiva adquisición de alteraciones genéticas en estados tardíos de la carcinogénesis causa una importante desregulación de distintas vías de señalización como TGF β , PI3K y AKT, las cuales afectan a genes que dirigen la oncogénesis como aquellos que codifican para NOTCH32, JAK1, IGF2 y MMPs. Lo

anterior apoya el concepto de que el inicio del cáncer es el resultado de múltiples alteraciones genómicas [30].

En estudios sobre el desarrollo del cáncer hepático realizados desde un historial de cirrosis en individuos infectados con HBV, se detectó una vaciación somática recurrente en el gen IGFALS (subunidad ácido-lábil de la proteína de unión a IGF) [30]. Esta mutación ocasiona una pérdida gradual de IGFALS, lo que conllevaría a una activación de la señalización de IGF y a la progresión del carcinoma hepatocelular. La activación de IGF también se mostró en pacientes con carcinoma hepatocelular cuyos tumores también mostraron tener asociación con la señalización de mTOR [36].

Análisis llevados a cabo en casos tempranos y avanzados de hepatocarcinoma revelaron que 48 genes estaban mutados en casos avanzados de la enfermedad, y este conjunto fue enriquecido con genes de la vía WNT- β -catenina [37]. Esta regulación anormal además llevó al enriquecimiento del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), TGF β y la vía de Hippo.

Alteraciones centrales en la formación del carcinoma hepatocelular incluyen aquellas que ocurren en genes que están relacionados con cuatro vías oncogénicas [38]:

- Procesos metabólicos
- WNT- β -catenina
- Modificación de la cromatina
- PI3K-AKT-mTOR.

Algunos estudios han hecho énfasis en la importancia de mutaciones que afectan a los factores modificadores de la cromatina, específicamente miembros del complejo de proteínas SWI/SNF [39], incluyendo mutaciones inactivantes prevalentes así como deleciones homocigóticas en los componentes de la familia ARID (ARID1A, ARID1B y ARID2D), lo cual sugiere que esos factores actúan como genes supresores de tumores [40-43].

2.3.1 Alteraciones del gen TP53

Hasta ahora, la alteración de genes más frecuente encontrada en cánceres humanos, es la que altera las propiedades del gen supresor de tumores TP53, un gen localizado en el cromosoma 17 (p13.1). Mutaciones germinales de este gen, son conocidas por ocurrir en algunos individuos con una predisposición a sufrir cáncer conocida como el síndrome de Li-Fraumeni [44]. P53 se comporta como un factor de transcripción multifuncional involucrado en el control del ciclo celular, muerte celular programada, senescencia, diferenciación y desarrollo,

transcripción, replicación del DNA, reparación del DNA y mantenimiento de la estabilidad genómica. En cáncer de hígado la mutación específica R249s en TP53 se encuentra en el 50% de los tumores en población expuesta a aflatoxina B1 [45, 46]. En contraste, pacientes que no habían sido expuestos a este agente carcinogénico tenían una menor prevalencia de mutaciones en TP53 y el codón 249 estaba raramente alterado. Otro punto importante de mutaciones en TP53 ocurre en pacientes con hemocromatosis hereditaria en el codón 220 [47].

2.3.2 Alteraciones genéticas que activan la vía WNT/ β -catenina

La β -catenina es el homólogo vertebrado de armadillo en *Drosophila Melanogaster*. Tiene una función doble, en la adhesión en la vía de Wnt. Además β -catenina forma un complejo con la E-caderina y cateninas de uniones adherentes que participa en la adhesión célula-célula. β -catenina puede adquirir actividad oncogénica como resultado de mutaciones dominantes en su extremo N-terminal [48]. Muchas de esas mutaciones llevan a la pérdida de fosforilación en los sitios consenso implicados en la regulación negativa de β -catenina por el complejo GSK3 β /APC/axina. Como consecuencia de estas mutaciones, los niveles de β -catenina se elevan en el citoplasma y en los núcleos de la activación de la transcripción de genes diana de Wnt. En el carcinoma hepatocelular en humanos, mutaciones en β -catenina han sido encontradas en alto porcentaje de los casos. También se encuentra alterado en la mayoría de los hepatoblastomas [49, 50], y en algunos adenomas hepatocelulares [51].

2.3.3 Alteraciones en los genes de retinoblastoma y p16^{INK4}.

La pérdida del cromosoma 13 se ha observado en una tercera parte de casos de carcinoma hepatocelular [52]. La región cromosómica delecionada comúnmente en tumores incluye el locus de RB1, localizado en 13q14, que codifica para el gen supresor de tumores RB1 que funciona en el desarrollo de la división celular, diferenciación y apoptosis en casi todos los tipos celulares.

El gen p16^{INK4} codifica para dos diferentes proteínas CDKN2 y ARF implicadas en la apoptosis dependiente de p53. Estas dos proteínas funcionan como supresores de tumores en la vía de retinoblastoma [53]. En diversos estudios realizados se encontró una pérdida en la heterocigocidad en el brazo corto del cromosoma 9, en la región de p16^{INK4}, en más del 20% de casos en cáncer hepático [52]. La inactivación de mutaciones somáticas y deleciones homocigóticas del gen son raramente observadas en carcinoma hepático [54].

2.3.4 Alteraciones genéticas e infección por HBV

La infección por HBV puede promover una carcinogénesis por varios mecanismos. La integración del DNA viral en el genoma del huésped induce inestabilidad cromosómica [55]. Se han descrito mutaciones insercionales en las que la integración del HBV en sitios específicos activa genes endógenos como el β -receptor del ácido retinóico, ciclina A y mevalonato kinasa [56-58]. Se han encontrado varios genes alterados por una integración del HBV en tumores, lo que sugiere que la integración viral en la región de genes que controlan la proliferación celular, viabilidad y diferenciación, son un mecanismo que se ha visto frecuentemente involuado en la hepatocarcinogénesis por HBV [59-61]. Por último un mecanismo de carcinogénesis relacionado con la infección por HBV está basado en la expresión de proteínas virales, como HBX, lo cual permite modular la proliferación y viabilidad celular [62, 63]. Se ha visto que HBX se une a p53 e inactiva las funciones que dependen de su activación, incluyendo la apoptosis mediada por p53 [64]. En la figura 2 se resumen algunas de las vías de señalización alteradas así como las principales mutaciones asociadas al HCC.

2.4 Origen del cáncer hepático

Los análisis genómicos sugieren que el cáncer primario de hígado deber se considerado como una continuidad de neoplasias superpuestas, y no como hechos aislados uno de otro. El alcance de este concepto depende en gran medida del fondo etiológico subyacente, la composición del ambiente previo a la lesión neoplásica, y lo más importante, la célula diana de la transformación maligna, es decir la célula de origen.

El hígado humano contiene tres tipos distintos de células residentes, las cuales podrían ser el potencial origen del cáncer hepático:

- Hepatocitos
- Células del epitelio biliar (colangiocitos)
- Células stem adultas o progenitoras

La oncogénesis hepática se caracteriza por tener una gama amplia y heterogénea de patrones histológicos que van desde el carcinoma hepatocelular y el colangiocarcinoma intrahepático, hasta aquel que mezcla los dos tipos [65].

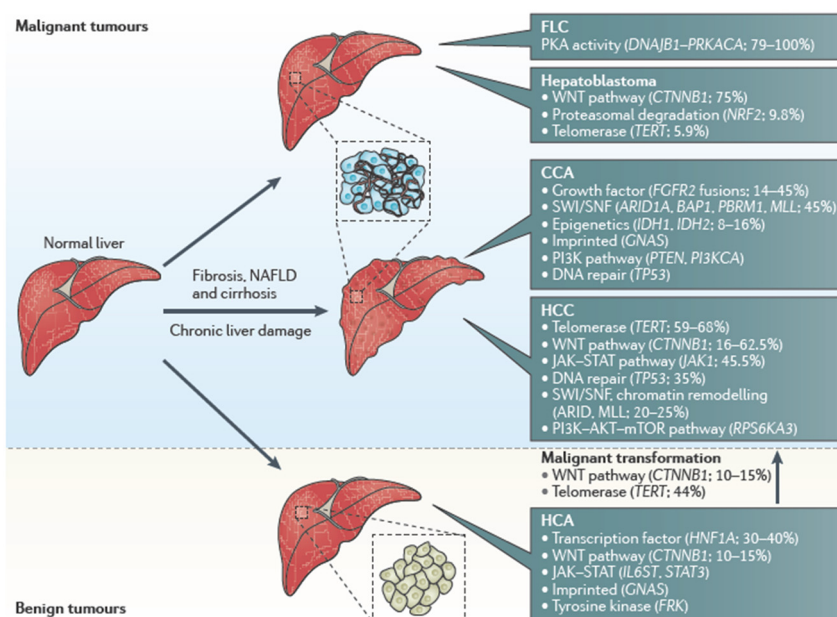


Fig 2. Marco de alteraciones genéticas del cáncer primario de hígado. La figura muestra el marco mutacional prevalente así como las rutas de señalización afectadas en cáncer de hígado primario maligno y benigno (PLCs). La mayoría de los cánceres hepáticos malignos se desarrollan bajo un fondo de daño hepático crónico y fibrosis, la enfermedad hepática grasa no asociada al consumo de alcohol (NAFLD) y la cirrosis son algunos de los iniciadores clave del carcinoma hepatocelular (HCC) y el colangiocarcinoma (CCA). Aunque existen tumores hepáticos que se presentan en la adolescencia como el hepatoblastoma y el carcinoma hepatocelular fibrolamelar (FLC), así como adenomas hepáticos benignos (HCAs), se desarrollan en hígados no cirróticos. Las variaciones genéticas más tempranas ocurren en el gen de la transcriptasa reversa de la telomerasa (TERT). ARID, dominio interactivo rico en A-T; BAP1, BRCA1, proteína 1 asociada a BRCA1; FGFR2, receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos; FRK, tirosina quinasa de la familia SRC relacionada con FYN; HNF1A, factor nuclear 1α de hepatocitos; IDH, isocitrato deshidrogenasa; IL6ST, transductor de señales de la interleucina 6; JAK, Janus quinasa; MLL, leucemia de linaje mixto; NRF2, factor nuclear eritroide 2, relacionado con el factor 2; PBRM1, polibromo 1; PKA, proteína quinasa A; RPS6KA3, proteína α3 ribosomal S6 quinasa; STAT, Transductor de señales y activador de la transcripción. Figura tomada de [29].

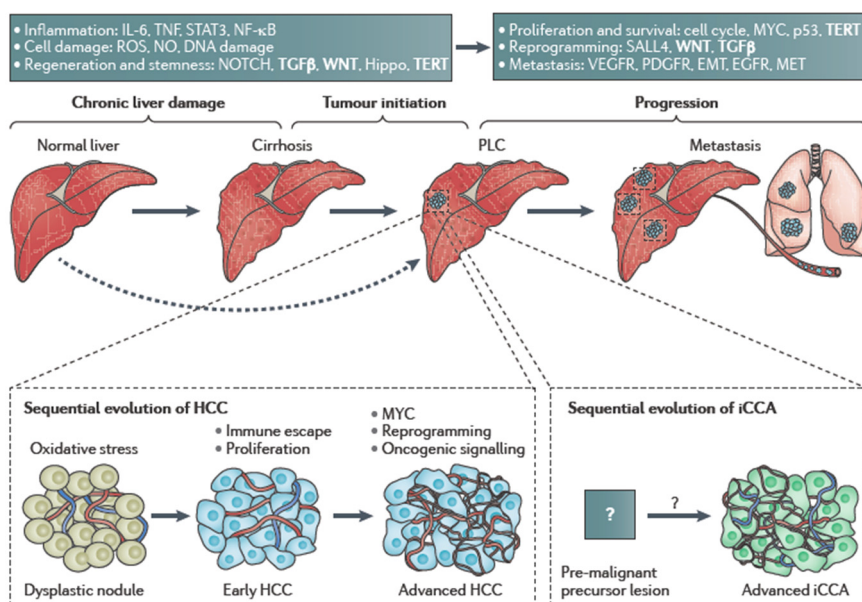


Figura 3. Evolución secuencial del PLC. La etapa final común de la mayoría de las enfermedades crónicas del hígado es el desarrollo de la cirrosis hepática. Por lo tanto, el microambiente hepático alterado inducido por cirrosis de manera crónica, podría considerarse un factor de predisposición necesaria para el desarrollo del cáncer en la gran mayoría de los cánceres de hígado primarios (PLCs). La flecha discontinua indica que una minoría de los tumores surgen de un hígado normal sin cirrosis y se convierten en PLC. En el carcinoma hepatocelular (HCC), un proceso de múltiples etapas se caracteriza por la ocurrencia de etapas distintas morfológicamente: nódulos displásicos, HCC temprano y HCC avanzado. De manera simultánea con la progresión de la enfermedad, se observa un aumento en la neovascularización que se refleja en el patrón hipervascular típico (en la figura, en el panel inferior; venas se representan en azul, y las arterias se representan en rojo). Para el colangiocarcinoma intrahepático (iCCA), la evolución secuencial y las características fenotípicas subyacentes no son bien conocidas. Aún está por dilucidarse la caracterización detallada de los eventos moleculares crónicos que producen daño en el hígado y en el desarrollo y la progresión de PLCs, así como la estratificación del riesgo molecular de las lesiones pre-malignas para así poder complementar la clasificación histológica. No obstante, ha sido identificada la superposición de varias vías moleculares que están estrechamente vinculadas tanto a la iniciación como a la progresión del cáncer de hígado (se muestra en negrita en la parte superior del panel). Éstas incluyen el factor-β de crecimiento transformante (TGF), las vías de WNT y la telomerasa transcriptasa inversa (TER). EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; EMT, la transición epitelio-mesenquimal; IL-6, interleuquina-6; NF-κβ, factor nuclear κβ; NO, óxido nítrico; PDGFR, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas; ROS, especies reactivas del oxígeno; SALL4, proteína 4 similar a Sal; STAT3, transductor de señales y activador de la transcripción 3; TNF factor de necrosis tumoral; VEGFR, receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular. Imagen tomada de [29]

2.4.1 Hepatocitos como origen del cáncer hepático

Dos de las características más importantes de los hepatocitos maduros son su longevidad y su elevado potencial de regeneración, el cuál mantienen sin perder sus propiedades funcionales [66, 67]. Lo anterior sustenta la susceptibilidad que poseen los hepatocitos a sufrir transformaciones malignas en el carcinoma hepatocelular, puesto que sufren una presión selectiva inducida por la muerte celular inflamatoria crónica, y existen diversos estudios de hepatocarcinogénesis en modelos animales que así lo demuestran [68].

Las vías de señalización que participan activamente en el cáncer hepático derivado de hepatocitos son p53, WNT- β -catenina, TGF β , el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF-MET), IGF e EGFR. Existen otras vías que son antagonistas, controlando el tamaño del órgano, el estado de diferenciación y la plasticidad de los hepatocitos, como las rutas de Hippo-YAP y la neurofibromina-2 (NF2)[69]. La activación de la ruta Hippo-YAP favorece un sobrecrecimiento en el tejido hepático, así como el desarrollo del carcinoma hepatocelular, a través de la regulación de programas transcripcionales clave mediados por YAP, como HNF4 α , JAG1, NOTCH, β -catenina y E2F [70, 71].

Según estudios realizados, los hepatocitos responden ante el daño biliar crónico y agudo, reprogramándose como células del epitelio biliar (BEC's) de manera dependiente de la vía de NOTCH [72-74]. De manera reciente también ha sido descrito que los hepatocitos derivados de células biliares recién formados, guardan en memoria su origen hepatocítico, en respuesta al daño excesivo, y vuelven a diferenciarse como hepatocitos cuando la lesión hepática ha sido eliminada [75]. Lo anterior implica que aunque los hepatocitos sean la potencial fuente del colangiocarcinoma intrahepático, es necesario que exista previamente la condición de daño permanente y extendido, y la transformación que ocurre se lleve a cabo muy probablemente en las células transdiferenciadas.

2.4.2 El origen del cáncer hepático a través de células stem y progenitoras

El concepto de que las células stem hepáticas pueden dirigir la carcinogénesis hepatobiliar y que son la fuente de la iniciación del tumor ha sido ampliamente estudiado, llevándose a cabo experimentos de carcinogénesis en hígado y de daño hepático en modelos en animales. Se piensa que las células stem hepáticas residen en los canales de Hering, que son las ramificaciones más distales del conducto biliar, y fueron caracterizadas como células con doble potencial

(pueden dan lugar a hepatocitos o a células epiteliales biliares) en el año 1944 por Opie, y posteriormente por Farber [76, 77].

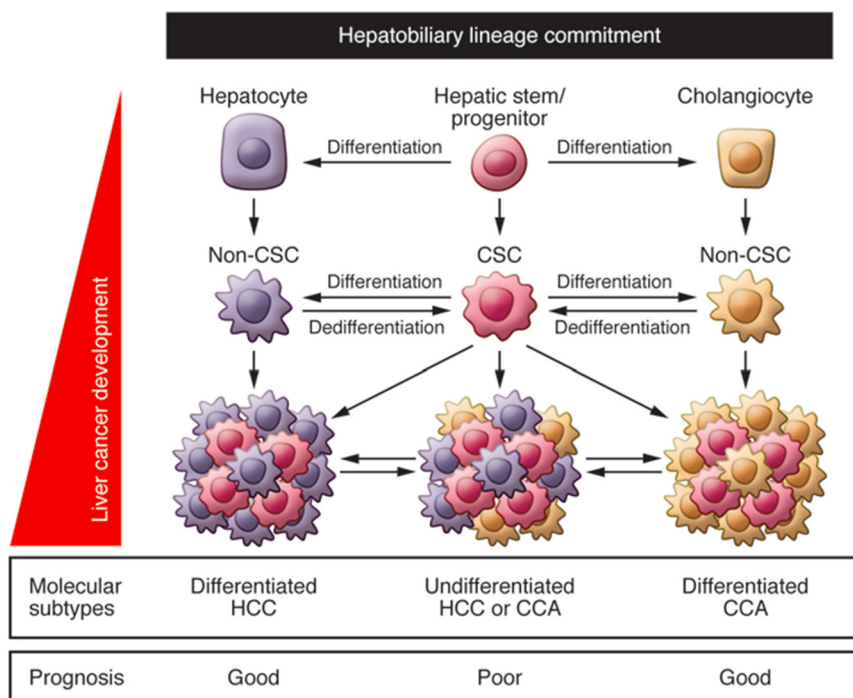


Figura 4. Evolución y origen de la células stem cancerígenas (CSC) de hígado.

Las células stem cancerígenas pueden provenir de células no stem mediante la activación de rutas de desdiferenciación. El desarrollo de las células stem de hígado podría estar regulado a través de programas que comprometen al linaje hepatobiliar y de rutas oncogénicas que son inducidas por cambios genéticos y epigenéticos mediante la activación de vías de señalización. La aparición y la dominancia de las CSC hepáticas pueden reflejar los subtipos moleculares de los cánceres de hígado vinculados al resultado clínico. CCA, carcinoma colangiocelular; CSC células stem cancerígenas; HCC, carcinoma hepatocelular. Ilustración tomada de [65].

Tabla 5. Principales vías de señalización y moléculas implicadas en cáncer primario de hígado. Tabla tomada de [29]

Functional process	Signalling pathway	Associated molecules	Tumour type	Mode of action in tumours	Phenotypic and tumour features	Refs
Cell cycle	p53 and RB-E2F	p53, CDKN2A, CDKN2B, cyclin D1, cyclin E1, CDKs, ATM and RB1	HCC and iCCA	Inhibition	Loss during tumour progression, aggressive phenotype and loss of DNA damage repair mechanisms	8,10,46
Development and differentiation	WNT- β -catenin	β -catenin, AXIN1, AXIN2 and APC	HCC	Activation	Genomic stability and activation in tumour-initiating cells (early and late stages)	10,46, 119
	TGF β	SMADs	HCC	• Early stage: inhibition • Late stage: activation	Poor prognosis, metastasis and activation in tumour-initiating cells	30,114
	NOTCH	NOTCH1-3, JAG1, NICD and DLL	iCCA	Activation	Cell fate and stem cell features	88,90, 119
	Hippo-YAP	YAP and MST1 or MST2 (growth control)	HCC	Activation	Stem cell features, tumour initiation and chemoresistance	78-80
	NF2	YAP and EGFR (growth control)	HCC	Inhibition	Stem cell features and tumour initiation	81,82
	SALL4	NuRD complex and PTEN	HCC	Activation	Development and progression, poor prognosis and activation in tumour-initiating cells	103
Proliferation and survival	IGF	IGF1R, IRF2, IRS, SHP and PI3K	HCC	Activation	Pre-neoplastic lesions (early stage)	8,27
	HGF-MET	SH2, MAPK, MEK and ERK	HCC	Activation	Metastatic potential and invasion	97
	EGFR	AKT, STATs and RAS-RAF	HCC and iCCA	Activation	Aggressive phenotype and reprogramming	59,97, 122,123
	PI3K-mTOR	PI3K α , AKT, RPS6KA3, PTEN, TSC1, RAPTOR and RICTOR	HCC	Activation	Poor prognosis, poorly differentiated tumours and earlier recurrence	10,27, 33
Angiogenesis	VEGF	VEGFR and HIF1 α	HCC	Activation	Aggressive phenotype, poor prognosis and metastasis	2,8,28
	FGF	FGF19, FGFRs and SHP2	HCC and iCCA	Activation	Tumour development or progression	56,59
		FGFR2 fusions	iCCA	Activation	Tumour progression and sensitivity to FGF inhibitors	52, 56-59
	PDGF	ROS, PI3K, STAT3 and MMPs	HCC	Activation	Liver cirrhosis and tumour development	114
Immune response	NF- κ B	I κ B, IKK, NEMO, p65 and IL-20	HCC	Activation	Chronic inflammation and tumour progression	111-116
	TWEAK-FN14	NOTCH and WNT	HCC	Activation	Tumour-initiating cells and cell fate decision	117,118
	IL-6 signalling	STAT3, LIN28, IL-6R, IL-6 and JAK1	HCC	Activation	Progenitor-derived response to adjuvant interferon therapy	106-114
Post-transcriptional modifications	RNA editing	AZIN1, ADARs and ODC	HCC	Alteration	Cirrhosis, tumour development and recurrence, and poor prognosis	44,45

Continuación Tabla 5. Principales vías de señalización y moléculas implicadas en cáncer primario de hígado [29].

Functional process	Signalling pathway	Associated molecules	Tumour type	Mode of action in tumours	Phenotypic and tumour features	Refs
Genome maintenance	Chromatin remodelling	ARID1, ARID2, MLL, BAP1 and EZH2	HCC and iCCA	Activation	Frequently mutated SWI/SNF and poor prognosis	10,14, 28,33–37, 50,54
	Epigenetics	IDH1 and IDH2	iCCA	Abnormal activity	Methylation status and overall survival	50,98
	Telomere stability	TERT	HCC	Activation	Earliest genetic changes, associated with activation of WNT- β -catenin	9,12, 24–26, 33,38
Stress response involving mitochondria	Oxidative response	NRF2, KEAP1 and CUL3	HCC and iCCA	Activation	Oxidative phosphorylation and tumour progression (late stage)	10,15, 33,53

2.5 Diagnóstico.

El hígado es el principal productor de proteínas del suero, además de que los cambios en la glicosilación realizados por patologías que se localizan en el hígado son fácilmente caracterizadas y utilizadas como potenciales marcadores diagnósticos. Este hecho ya ha sido utilizado para el diagnóstico del carcinoma hepatocelular mediante la detección de perfiles de glicosilación en la AFP, una proteína del suero [78]. En pacientes adultos la AFP típicamente está presente solo en el suero de pacientes con carcinoma hepatocelular [79]. La glicosilación es una modificación de proteínas a nivel postraduccional, la cual puede afectar las propiedades celulares tales como la adhesión, tráfico, señalización, mediando aspectos del sistema inmunitario innato, e incide en las interacciones hospedero-patógeno y el plegamiento de proteínas [80, 81]. La glicosilación es el proceso de formación de cadenas de oligosacáridos como los glicanos, este proceso ocurre en muchas proteínas ya sea solubles o unidas a la membrana. Este proceso es dirigido por enzimas específicas del sitio. Existen dos vías principales de glicosilación, denominadas N-ligada y O-ligada. La glicosilación de proteínas alteradas se ha relacionado con diversas patologías como el cáncer [81]. Debe sospecharse la existencia de un hepatocarcinoma en cualquier paciente que presente una enfermedad hepática subyacente, del tipo cirrosis, hepatitis crónica etc, lo cual implica un aumento en la cantidad de α -fetoproteína (AFP). Normalmente mediante técnicas de imagen se confirma la existencia de una lesión. En pacientes cirróticos, un nódulo sólido dominante debería considerarse como un carcinoma hepatocelular hasta que otras pruebas demostrasen lo contrario. En especial, si se tratara de una lesión hipervascular que se asocia a la elevación de AFP.

Los síntomas más comunes en pacientes con hepatocarcinoma incluyen dolor abdominal, pérdida de peso, astenia, saciedad precoz, sensación de plenitud postprandial, anorexia, distensión abdominal, ictericia y vómitos. Otros síntomas pueden deberse a la existencia de metástasis. Sin embargo un amplio porcentaje de pacientes con hepatocarcinoma en estadios avanzados permanecen asintomáticos.

2.5.1 Clasificación del tumor hepático

Actualmente existen múltiples sistemas pronósticos y de clasificación de los tumores hepáticos. Todos tienen en cuenta la gravedad de la patología hepática de base, el tamaño del tumor, la extensión de las estructuras adyacentes y la presencia de metástasis a distancia.

El sistema mas ampliamente utilizado tanto por la Unión Internacional del Control del Cáncer (UICC, Union for International Cancer Control) como por el Comité conjunto de Cáncer en América (AJCC American Joint Committee on Cancer), es el conocido como Tamaño del tumor, Nódulos linfáticos invadidos y metástasis (TNM) que toma en cuenta como los factores pronósticos más importantes para la presencia de la invasión vascular y el grado de fibrosis en el hígado subyacente (Tabla 6) [82].

Los tumores múltiples, la invasión vascular y la extensión linfática son factores pronósticos adversos. Los tumores de gran tamaño en la mayoría de los casos tienen invasión vascular a nivel microscópico, la cual solamente puede ser apreciada tras ser resecado, por lo que su clasificación no puede hacerse sino hasta ese momento.

Existen otras clasificaciones igual de útiles en función del cuadro clínico que el paciente presenta, la clasificación de Okuda en el caso de los pacientes con cirrosis resulta ser de más utilidad, que toma en cuenta la gravedad de la cirrosis y tamaño del paciente a través de tres parámetros: ascitis, albúmina sérica y niveles de bilirrubina. Sin embargo, esta clasificación no toma en consideración la existencia de invasión vascular ni la presencia de metástasis (Tabla 7) [83, 84]. La clasificación más reciente desarrollada es la Italiana CLIP (Programa del cáncer Italiano de hígado). Que combina aspectos relacionados directamente con el tumor, con un índice de gravedad de cirrosis, generando una escala pronóstica de 0 a 6 (Tabla 8) [85].

La clasificación del Clínic de Barcelona (BCLC), consta de cuatro estadios, y está basada en la extensión de la lesión primaria, estado del comportamiento (performance status), la presencia de síndrome constitucional, invasión vascular, extensión extrahepática y el estadio de Okuda [84, 86] (Figura 4).

Tabla 6. Clasificación TNM para Carcinoma hepatocelular. Tabla tomada de [23].

Clasificación TNM para carcinoma hepatocelular.			
Tumor primario (T)			
Tx: No puede evaluarse el tumor primario.			
T0: No hay evidencia de tumor primario			
T1: Tumor solitario sin invasión vascular			
T2: Tumor solitario con invasión vascular, o tumores múltiples que individualmente no sobrepasen los 5cm.			
T3: Tumores múltiples de mas de 5 cm o tumor que invade una rama principal de las venas porta o hepática.			
T4: Tumores con invasión directa de órganos adyacentes además de la vesícula biliar o con perforación del peritoneo visceral.			
Ganglios linfáticos Regionales (N)			
Nx: No pueden evaluarse los ganglios linfáticos regionales			
N0: No hay metástasis en glanglio linfáticos regionales			
N1: Metástasis en ganglios linfáticos regionales.			
Metástasis a distancia (M)			
Mx: No puede evaluarse la presencia de metástasis a distancia			
M0: Nos hay metástasis a distancia			
M1: Metástasis a distancia			
Agrupación por estadios			
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio IIIA	T3	N0	M0
Estadio IIIB	T4	N0	M0
Estadio IIIC	Cualquier T	N1	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla 7. Clasificación de Okuda. Tabla tomada de [23].

Clasificación de Okuda		
Criterio	Positivo	Negativo
Tamaño tumoral	> 50% del parénquima hepático	< 50%
Ascitis	Clínicamente detectable	Clínicamente no detectable
Albúmina	< 3 mg/dL	>3 mg/dL
Bilirrubina	>3 mg/dL	< 3 mg/dL
Estadios		
I	Ningún criterio positivo	
II	Uno o dos criterios positivos	
III	Tres o cuatro criterios positivos	

Tabla 8. Clasificación CLIP. Tabla tomada de [84].

Clasificación CLIP	
Criterio	Puntuación
Estadio Child-Pugh	
A	0
B	1
C	2
Morfología Tumoral	
Nodulo único y extensión $\leq 50\%$ del parénquima hepático	0
Nódulos múltiples y extensión $\leq 50\%$ del parénquima hepático	1
Afectación masiva o extensión > 50% del parénquima hepático	2
Alfa-fetoproteína (ng/mL)	
<400	0
≥ 400	1
Trombosis venosa portal	
No	0
Sí	1

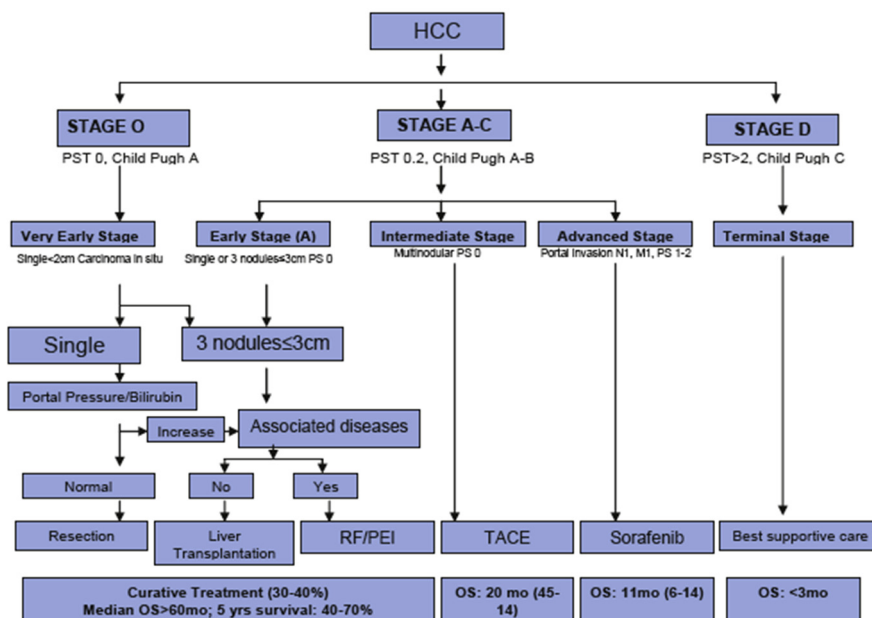


Figura 4. Sistema de clasificación BCLC. Imágen tomada de [84].

2.6 Terapia contra el cáncer Hepático

El tratamiento del hepatocarcinoma es complicado puesto que existen una gran variedad de opciones terapéuticas, y un número elevado de patologías hepáticas de base que se observan en los pacientes.

Las opciones terapéuticas son dependientes del estadio de la enfermedad y se clasifican en tres categorías [10]:

- Curativas
- Paliativas
- Sintomáticas

2.6.1 Resección quirúrgica

El cáncer de hígado es curable si el tumor se extirpa mediante una intervención quirúrgica. Este tratamiento es recomendado para aquellos pacientes con un solo nódulo, que observan una buena función hepática y un buen estado general [87], solamente la mitad de los pacientes candidatos a cirugía presentan tumores realmente resecables, ya que puede que exista enfermedad multifocal, extensión extrahepática, una reserva funcional hepática inadecuada, que no sea

posible conseguir márgenes libres, o que se encuentre comprometida la circulación portal o hepática.

La oclusión preoperatoria de la vena porta se lleva a cabo en algunas ocasiones para provocar una atrofia en el lóbulo en el cual se encuentra el tumor, logrando así una hipertrofia compensadora en el resto del órgano [88].

Se compara una cirugía abierta con la hepatectomía mediante técnica laparoscópica, ésta última disminuye la pérdida de sangre en el paciente, por lo que los requerimientos de transfusión y cuidados postoperatorios posteriores son mínimos, así como la disminución en el tiempo de recuperación e ingreso hospitalario [89].

Aquellos pacientes candidatos a una cirugía han de ser evaluados de manera extensiva, con estudios preoperatorios muy detallados incluyendo la realización estudios radiológicos como el TAC, la RMN o la angiografía, así como del estado funcional del hígado no tumoral.

Sin embargo no siempre es posible la intervención quirúrgica con resección completa del tumor. Para algunos casos existen otros tratamientos disponibles, como la quimioterapia intraarterial (también denominada quimioembolización o TACE), inyección percutánea de etanol, ablación con radiofrecuencia, crioterapia o tratamiento sistémico [10]. De manera excepcional se puede valorar un trasplante hepático, aunque la idoneidad de esta medida depende de un estudio pormenorizado de cada situación.

2.6.2 Terapia ablativa local

La ablación de los tumores puede llevarse a cabo utilizando métodos químicos o físicos. La primera técnica usada en el tratamiento local del carcinoma hepático fue la técnica PEI (Inyección percutánea de etanol) [90]. Las técnicas ablativas utilizando técnicas físicas como la temperatura hasta ahora han avanzado, incluyendo la técnica de RFA (Radiofrecuencia) [91], ablación por microondas (MWA) [92], por técnicas de laser[93], y la crioablación [94].

2.6.2.1 Inyección percutánea de etanol

Este tratamiento está indicado para eliminar los nódulos del hepatocarcinoma [95], cuyo mecanismo de acción es la deshidratación citoplasmática que provoca una necrosis coagulativa, con una posterior reacción fibrótica. Destruye de manera directa las células neoplásicas, pero también las células sanas de alrededor. Afecta a las células endoteliales y provoca una agregación plaquetaria, lo que conlleva a una trombosis de la microvasculatura del tumor, y

finalmente a una isquemia tumoral. Se requiere un mínimo de 3 inyecciones para obtener un resultado exitoso en el tratamiento [96] , con sus consiguientes complicaciones que ocurren en bajos porcentajes de los casos, como hemorragias intraperitoneales, insuficiencia hepática, etc. La mayor parte de las recurrencias se producen en distintas localizaciones dentro del hígado. Llegándose a observar en algunos casos la disminución de éstas recurrencias y un aumento en la supervivencia, si luego de la inyección de etanol se emplea α -interferón de manera adyuvante.

2.6.2.2 Ablación por radiofrecuencia

Esta técnica es superior a otras terapias ablativas, y es el método más comúnmente utilizado reemplazando a la PEI como la terapia localizada de elección para el carcinoma hepático temprano [95]. La técnica consiste en la aplicación de energía térmica a alta frecuencia mediante un electrodo colocado directamente sobre la lesión. Los efectos adversos graves no se dan de manera frecuente, como el fallo hepático, trombosis venosa portal, absceso hepático, derrame pleural, quemaduras cutáneas, neumotórax, hematoma hepático, entre otros.

2.6.2.3 Crioablación

La crioablación utiliza bajas temperaturas para destruir los tejidos anormales, mediante la utilización de nitrógeno líquido o argón [97] directamente sobre el tumor, consiguiendo así un daño celular directo, formando cristales intracelulares que provocarán una deshidratación y una ruptura celular. Las complicaciones de esta técnica empleada en la terapia contra el carcinoma hepático pueden ser graves, al grado de que el paciente debería ser monitorizado en cuidados intensivos al menos las 24 horas posteriores al tratamiento. Tales complicaciones incluyen: ruptura hepática, hipotermia con arritmias cardíacas, fistula biliar, hemorragia intraperitoneal, shock criogénico absceso hepático, derrame pleural etc. Actualmente, y debido a los numerosos efectos adversos descritos, la crioterapia ha sido prácticamente dejada de utilizar.

2.6.3 Quimioembolización transarterial

Debido a que la mayor parte del suministro sanguíneo en el hígado proviene de la arteria hepática [98], el propósito de ésta técnica es bloquear el aporte de

sangre mediante la embolización con partículas o la administración de quimioterapia directamente sobre el tumor [99], induciendo de esta manera una necrosis. La técnica más empleada es la utilización de agentes quimioterapéuticos, además de un agente promotor de la coagulación dentro de la arteria hepática, con lo que así es posible conseguir una mayor eficacia antitumoral debido a la oclusión simultánea de la arteria hepática. Los efectos adversos más comúnmente observados son denominados globalmente como síndrome postembolización que incluye fiebre, dolor abdominal, anorexia y en algunos casos elevación transitoria de las transaminasas.

2.6.4 Trasplante hepático

El trasplante hepático es sin duda el mejor tratamiento para aquellos pacientes que presentan un fondo cirrótico en el carcinoma hepatocelular. En general el trasplante es recomendado en aquellos pacientes que cumplen los criterios de Milan [100], primordialmente:

- El paciente no es candidato a resección hepática
- El tumor es único y mide no más de 5 cm de diámetro máximo, o existe un máximo de 3 lesiones, la mayor de las cuales no rebase los 3 cm de diámetro.
- No existe invasión vascular
- No existe invasión extrahepática del tumor en ganglios linfáticos, pulmón, órganos abdominales y hueso.

El inconveniente de la técnica de trasplante es el hecho de la progresión de la enfermedad durante el tiempo que el paciente permanece en la lista de espera, por lo que en algunos casos quizás sería mejor la utilización de otras técnicas menos invasivas como las descritas anteriormente, antes de la llegada del trasplante. También es una opción el trasplante de donante vivo aunque se realiza en el menor de los casos.

2.6.5 Quimioterapia sistémica

Esta terapia no se ha empleado de manera tradicional en el tratamiento del carcinoma hepatocelular, debido a que ésta se ha comportado como resistente a la terapia [101], ya que son múltiples los genes implicados en el desarrollo de dichas resistencias. También la diversidad tan heterogénea de pacientes que presentan la enfermedad ha sido uno de los factores más importantes. Adicionalmente el fondo de enfermedad hepática de base que manifiestan los pacientes condiciona la tolerancia a los fármacos empleados [102-104], como

doxorubicina, gemcitabina, cisplatino, 5-fluorouracilo, observándose tasas de respuesta que no llegaron al 10%.

2.6.6 Terapias moleculares dirigidas

A nivel molecular, la hepatocarcinogénesis está asociada con alteraciones a nivel genético y epigenético, dichas alteraciones conllevan a un crecimiento descontrolado de los hepatocitos. Distintas vías de transducción de señales, oncogenes y factores de crecimiento junto con sus receptores actualmente son considerados como potenciales dianas terapéuticas para las terapias sistémicas dirigidas, limitando la toxicidad sistémica extendida [28].

2.6.6.1 Sorafenib

Es un inhibidor multiquinasa administrado por vía oral con una elevada actividad antiangiogénica y antiproliferativa[105], que interviene en la regulación negativa de proteínas antiapoptóticas, favoreciendo el aumento de la citotoxicidad en las células hepáticas tumorales por el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand)[106].

2.6.6.2 Otras terapias dirigidas

Puesto que existe una elevada densidad en la vascularización, así como altos niveles de VEGF en cánceres hepáticos, los fármacos antiangiogénicos inhibidores de la actividad tirosina quinasa, sunitinib, lenvatinib y brivanib, también han sido utilizados en la terapia contra el carcinoma hepatocelular. Sin embargo no fueron superiores en efectividad al compararse con aquellos pacientes con estadios avanzados de hepatocarcinoma que solamente fueron tratados con sorafenib, o como una terapia de segunda línea [107]. Esto probablemente ocurre por el hecho de que al inhibir una sola vía de señalización puede inducirse una activación de otras vías. Adicionalmente la terapia combinada ha demostrado una actividad sinérgica beneficiosa en el tratamiento para el cáncer hepático [108].

3. Hipoxia y el factor inducible por hipoxia (HIF).

La metástasis es la principal causa de muerte en los pacientes con cáncer [109]. Los tumores sólidos contienen regiones hipóxicas con una tensión de oxígeno considerablemente más baja que los tejidos normales. La hipoxia intratumoral

surge cuando las células están localizadas demasiado lejos de un vaso sanguíneo funcional como para que la difusión del oxígeno sea la adecuada. Esto ocurre cuando las células del tumor proliferan rápidamente y los nuevos vasos son estructural y funcionalmente anormales. Cuando la concentración de oxígeno es demasiado baja se produce la muerte celular y la selección de las células cancerosas. En estas células las vías apoptóticas se inactivan y las antiapoptóticas y las que promueven la invasión y la metástasis se activan para permitir a la célula escapar del ambiente hipóxico [110].

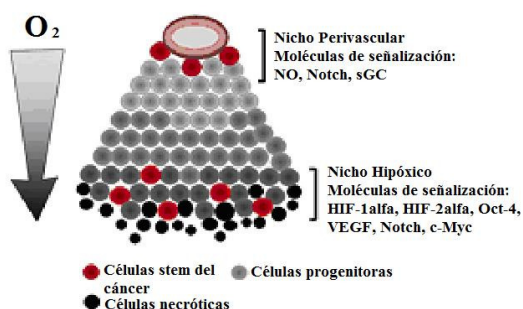


Figura 5. Gradiente de oxígeno en el desarrollo del proceso tumoral. A medida que nos alejamos del vaso sanguíneo, la concentración de O_2 disminuye, el ambiente se vuelve hipóxico y se puede producir la muerte de células normales y la selección de las células cancerosas. Imagen modificada de [111].

Las limitaciones de oxígeno controlan la neovascularización, el metabolismo de la glucosa, la supervivencia y la expansión del tumor [112]. La hipoxia confiere resistencia a tratamientos de radioterapia y quimioterapia e incrementa la capacidad metastática del tumor. La hipoxia intratumoral es esencial para la reparación de los vasos dañados y para el recrecimiento del tumor después de la irradiación [113]. Por otro lado, la hipoxia es un factor importante que induce la expresión de ciertos reguladores de la EMT y coordina la interacción entre estos reguladores como Snail1, Zeb1, SIP1, E47 y LOX (lisiloxidasas) [109].

Algunos factores de crecimiento y la hipoxia son claves para la regulación de procesos como la angiogénesis. En este proceso, las células del tumor envían señales que inician la formación de nuevos vasos sanguíneos. Estos nuevos vasos del tumor muestran malformaciones estructurales, flujo de sangre caótico y regiones locales hipóxicas. Existen al menos dos factores que son clave para iniciar este proceso: VEGF y Ang-2. El VEGF se expresa en la mayoría de las células y dirige la formación de los nuevos vasos en las zonas del tumor con tensión de oxígeno baja [112]. La segunda molécula es Ang-2, un ligando cuyo receptor está restringido a células endoteliales y que permite la remodelación de vasos sanguíneos [112].

La hipoxia induce al factor inducible por hipoxia (HIF) y por tanto éste se expresa en las células tumorales hipóxicas [113]. El HIF es un factor de transcripción que regula procesos fundamentales en la célula en respuesta a cambios en la concentración de oxígeno [114]. Forma un heterodímero con HIF-1 β , subunidad que se expresa de forma constitutiva, y una de estas tres subunidades reguladas por oxígeno: HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α . La activación del HIF es un proceso que ocurre en varios pasos: estabilización de HIF-1 α , translocación al núcleo, heterodimerización, activación transcripcional e interacción con otras proteínas. Una vez en el núcleo, el HIF se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HREs) [112], que están en el promotor de genes diana; parece que grupos de genes ligeramente diferentes son activados por estas dos subunidades [115]. El HIF no es sensible de una forma directa a las variaciones en la tensión de oxígeno, la regulación de la respuesta a hipoxia está dirigida por tanto, por una clase de dioxigenasas, la actividad de estos enzimas es estrictamente dependiente de la tensión de oxígeno. Existen dos tipos de sensores al oxígeno que controlan la acción del HIF: proteínas con un dominio proil hidroxilasa (PHD) y proteínas asparaginil hidroxilasas (FIH). Estos dos tipos de enzimas hidroxilan residuos del HIF e inducen su degradación, a través de la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (VHL), o inactivación respectivamente [112].

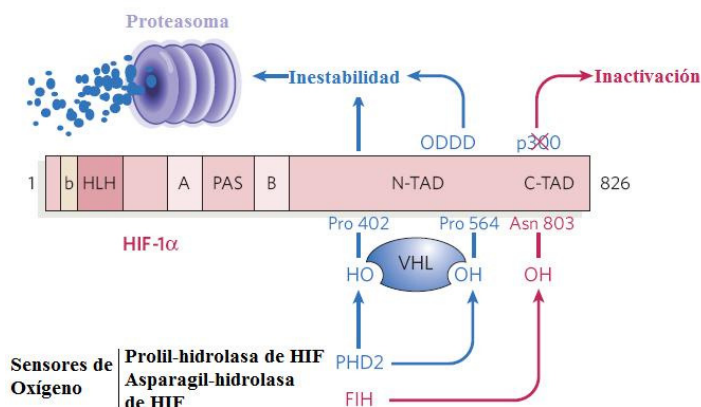


Figura 6. Sensores de oxígeno que contribuyen a la destrucción e inactivación de HIF-1 α . Dos sensores de oxígeno denominados PHD, (proteína con un dominio prolil-hidroxilasa y FIH, (factor que inhibe al HIF-1), determinan respectivamente la estabilidad y la activación de HIF-1 α . Imagen modificada de [112].

Otro mecanismo que podría regular la expresión del HIF sería el estrés oxidativo. Las ROS podrían incrementar la expresión del HIF modulando los niveles de HIF-1 α y su actividad transcripcional [116].

3.1 Resistencia a fármacos mediada por hipoxia

Desde que el fenómeno de la resistencia a múltiples fármacos (MDR) fue descubierta en 1970 por Biedler, este fenómeno de resistencia que sufren las células cancerígenas continúa siendo un obstáculo para la efectividad de la quimioterapia en los tumores sólidos [117, 118].

Los mecanismos precisos de MDR en cada tumor son complejos, implican múltiples factores y de manera general se clasifican en tres categorías: resistencia farmacocinética, resistencia intrínseca de la célula tumoral, y factores tumorales relacionados con el microambiente [119, 120].

Una concentración intratumoral no adecuada, el metabolismo hepático alterado y la vascularidad anormal del tumor, representan importantes factores en los mecanismos de resistencia a fármacos. El microambiente tumoral está fuertemente definido por una marcada tasa de proliferación celular y por regiones con hipoxia y acidez, todos estos factores pueden ejercer una profunda influencia en la sensibilidad del tumor a la quimioterapia [121, 122].

El efecto negativo que ejerce la hipoxia en la efectividad de la quimio y radioterapia se ha conocido desde hace varias décadas [123, 124], no obstante mediante estudios actuales se han empezado a comprender las bases genéticas y moleculares del fracaso en la terapia mediada por la hipoxia.

Como se mencionó anteriormente el regulador más importante en la adaptación de las células a la hipoxia, es el factor inducible por hipoxia (HIF) de la familia de factores de transcripción. Los HIFs están involucrados en aspectos clave de la biología tumoral, como lo son la angiogénesis, la resistencia a la apoptosis, la supervivencia celular, la reprogramación metabólica [125].

3.2 El papel de los HIFs en la biología tumoral

Los HIFs desempeñan distintos e importantes papeles en el proceso de tumorogénesis. En diferentes estudios se ha visto que HIF-1 α y HIF-2 α están sobreexpresados en la mayoría de los cánceres humanos y sus metástasis [126, 127]. De manera general, la expresión de HIF-1 α y HIF2 α está fuertemente relacionada con un fenotipo tumoral más agresivo, y un mal pronóstico de supervivencia, poniendo de manifiesto el fuerte impacto que estos factores ejercen en la promoción del tumor [128, 129].

Los HIFs de manera general promueven la progresión del cáncer, no obstante existen excepciones en las que HIF-1 α y HIF2 α representan un factor negativo para el crecimiento tumoral y por lo tanto está asociado con un aumento en la supervivencia del paciente [130]. La inhibición de HIF-1 α en un modelo

xenograft disminuye el crecimiento del tumor, mientras que la pérdida de la expresión de HIF-2 α se asoció con un avanzado estadio del tumor en cáncer de colon [131]. De manera opuesta, en estudios de cáncer renal se observó que la sobreexpresión de HIF-2 α promovió el crecimiento del carcinoma de células renales en modelos xenograft, mientras que la sobreexpresión de HIF-1 α inhibió el crecimiento del tumor [132]. La conclusión más importante de éstas observaciones se centra en definir el papel de los HIFs como promotores en la progresión del cáncer, sin embargo resulta difícil establecer el papel que cada uno desempeña, dado que las dos subunidades α pueden tener efectos opuestos en el crecimiento del tumor. La contribución de las subunidades α a la tumorigénesis es específica y varía en función del contexto y del tejido en estudio, por lo tanto cada una requiere una consideración individual [133].

4. MUERTE CELULAR

La muerte celular es ampliamente conocida como un fenómeno importante en el desarrollo normal de vertebrados e invertebrados. Es una respuesta celular fundamental que tiene un papel crucial durante el desarrollo, y en la regulación de la homeostasis del tejido mediante la eliminación de las células no deseadas. En el caso del cáncer, donde se ha visto que existen mecanismos de proliferación y muerte celular alterados, las células responden de manera incrementada a las señales de proliferación y supervivencia, y por ello son capaces de evadir la respuesta apoptótica [134].

La activación inapropiada de la muerte celular es también la causa principal de la lesión tisular y declive funcional en un gran número de enfermedades agudas tales como, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio y trauma cerebral y enfermedades crónicas como la diabetes y la neurodegeneración.

La muerte celular, se puede clasificar en tres grandes clases: apoptosis, autofagia y necrosis.

4.1 Muerte celular programada

Es una serie de eventos que culminan en la muerte de la célula de forma genéticamente regulada. Este tipo de muerte celular se realiza de una forma ordenada y silenciosa, y confiere ventajas al conjunto del organismo durante su ciclo vital.

La primera forma de muerte celular regulada o programada (PCD) que se caracterizó fue la apoptosis, que se describió en *Caenorhabditis elegans* a finales de los años 1980 y principios de 1990 [134]. Numerosas evidencias

experimentales ponen de manifiesto que la apoptosis no es el único mecanismo de suicidio celular. Dependiendo del tipo celular y del tipo de estímulo de muerte, cuando las células están preparadas para morir éstas pueden seleccionar entre distintas vías de muerte. Estudios morfológicos sobre el desarrollo de vertebrados permitieron en 1973 definir tres tipos de muerte celular fisiológica: heterofagia, autofagia y muerte no lisosomal. Estos tres tipos pueden distinguirse en función de la localización y papel de los lisosomas [135, 136]. La heterofagia corresponde a lo que hoy conocemos como apoptosis. De manera relativamente reciente además de la apoptosis como muerte celular programada, también se considera la autofagia, la necroptosis y la muerte mediada por PARP-1.

4.1.1 Apoptosis

Fue descrita inicialmente en el año 1972 por Kerr, proviene del latín *apo* (aparte, algo que se desprende) y *ptosis* (cadáver, algo inerte)[137]. Debido a su naturaleza conservada y uniforme, la apoptosis se define como una vía de muerte celular regulada que implica la activación secuencial de las caspasas, una familia de proteasas, y que se controla tanto positiva como negativamente por proteínas de la familia BCL2. La muerte celular apoptótica se caracteriza por rasgos morfológicos distintivos, incluyendo la fragmentación nuclear, formación de burbujas en la membrana y la formación de cuerpos apoptóticos [138], eventos utilizados para identificar la muerte celular apoptótica. Dentro de la célula en apoptosis, los orgánulos pueden presentar sutiles alteraciones bioquímicas, como proteólisis o permeabilización de membranas [139-141]. Cada célula puede recibir señales de estrés y alteraciones patogénicas, iniciando de esta manera respuestas locales o globales, llevándola a la adaptación o bien cuando un umbral de daño ha sido alcanzado, conllevan a la muerte celular. La apoptosis puede ser inducida a través de receptores de membrana que estimulan la “vía extrínseca” o bien por el desequilibrio en la homeostasis celular, “vía Intrínseca” [142]. Se ha descrito que factores como el daño al DNA nuclear, y el agrupamiento de los receptores de muerte en la membrana plasmática, son unos de los principales desencadenantes de la apoptosis.

4.1.1.1 Vías de señalización de apoptosis

Como se mencionó anteriormente, existen dos vías principales mediante las cuales se presenta el proceso apoptótico en la célula, en función del origen del estímulo de muerte. Ambas rutas pueden ser paralelas para desencadenar de

manera más eficiente el proceso de apoptosis, o bien, ser sólo una de ellas la encargada de llevar a la célula a la muerte. En la figura 7 se describen las principales vías de señalización de la apoptosis.

Vía intrínseca

Esta vía se inicia en respuesta a varios estímulos de muerte, los cuales ocurren dentro de la célula, tales como el daño al DNA y la activación de oncogenes. Esta ruta está regulada a través de la mitocondria, la cuál, responde a los estímulos; induciéndose la permeabilización de su membrana, y en consecuencia, liberando proteínas de su espacio intermembranal hacia el citoplasma, como el citocromo *c* que estimula el ensamblaje del apoptosoma en el citosol y la activación de caspasas, SMAC (*Second mitochondria-derived activator of caspases*)/DIABLO (direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein with low pI), AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), el cual activa una DNasa localizada en el núcleo, entre otras [142]. Defectos en la cadena transportadora de electrones pueden inducir la formación de ROS causando peroxidación lipídica y daños en la membrana mitocondrial [143].

Vía Extrínseca

La familia de receptores de muerte, la cual incluye al receptor del factor de necrosis tumoral (TNRF), Fas, DR3, TRAIL-R1/2 (DR4/5) y DR6, pueden dar inicio a la activación de la ruta extrínseca llevando la célula hacia la apoptosis [144].

La similitud entre los miembros de esta familia se basa principalmente en las regiones de los citoplasmáticas de los receptores de muerte o denominados como dominios de muerte (DD), que, cuando se unen el receptor al ligando adecuado, reclutan a través de interacciones homotípicas a FADD (proteína con dominio de muerte asociado a Fas). FADD posee un dominio efector de muerte único (DED) que es quien permite el acoplamiento con (death-inducing signaling complex) las procaspasas iniciadoras 8 y 10, mediante la unión con el DED de las caspasas. La unión de estas caspasas al complejo DISC favorece su autofragmentación y activación para dar paso al inicio del proceso proteolítico masivo. La actividad proapoptótica del complejo DISC puede ser inhibida por la proteína c-FLIP que impide la unión de la casapasa-8 al complejo inhibiendo su activación [145].

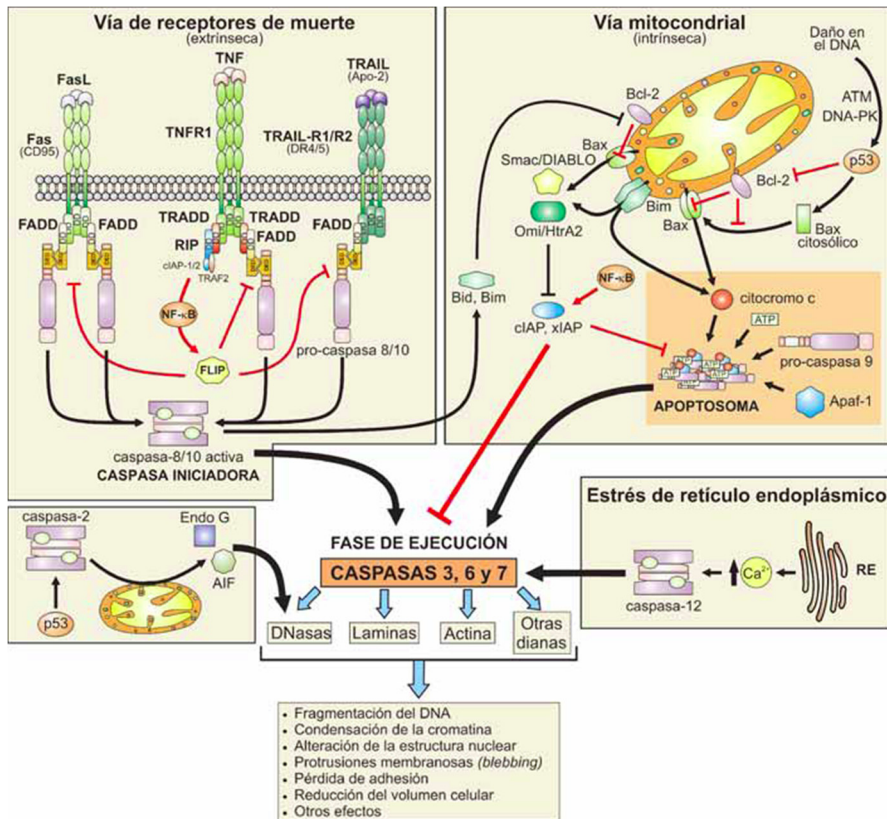


Figura7. Principales rutas de apoptosis.

4.1.2 Autofagia

La autofagia (del griego auto “actuar sobre si mismo” y phagos “comer”) se ha clasificado como una forma alternativa de muerte celular programada. Es un proceso catalítico conservado a lo largo de la evolución, se encuentra implicado en la remodelación tisular durante el desarrollo, y está considerada como una ruta de degradación celular implicada en la eliminación tanto de orgánulos subcelulares como de proteínas, dañados o superfluos. Este proceso también se utiliza como mecanismo de defensa frente a una invasión viral y bacteriana. La autofagia como mecanismo de supervivencia hace que los constituyentes celulares se reciclen, proporcionando una fuente de energía alternativa durante períodos de estrés metabólico, y participa de esta manera en el mantenimiento de la homeostasis y viabilidad celular [146].

La autofagia se caracteriza por la presencia de vesículas de doble membrana que se encuentran dentro del citoplasma, en las que se engloban los componentes celulares, llamadas autofagosomas, cuyo contenido es degradado por enzimas

lisosomales una vez fusionados los autofagosomas con los lisosomas. Aunque existen menos estudios dedicados a la investigación de este proceso de muerte celular, las investigaciones llevadas a cabo sobre la pérdida de función de genes han permitido situarla tanto como un mecanismo de muerte celular como de supervivencia, y relacionarla con procesos patológico tales como el cáncer, neurodegeneración, envejecimiento e inmunidad [147, 148].

La autofagia transcurre por proteólisis asociada a la vía de la ubiquitina, y el DNA no se fragmenta [149]. En algunos sistemas se ha descrito que la degradación vía ubiquitina también es una característica de la ruta apoptótica, existiendo también otras similitudes entre ambos procesos. Se han descrito grupos de genes conocidos como *ATG* (*autophagy-related*), conservados en organismos más simples como las levaduras hasta los humanos, que están implicados en la supervivencia y en la muerte celulares. El producto de uno de estos genes, la beclina-1 tiene un dominio BH3 por el que interacciona con la proteína Bcl-2, lo que refleja una regulación convergente de apoptosis y autofagia [134]. En la figura 8 se muestra un esquema de los pasos a través de los cuales se desarrolla la autofagia

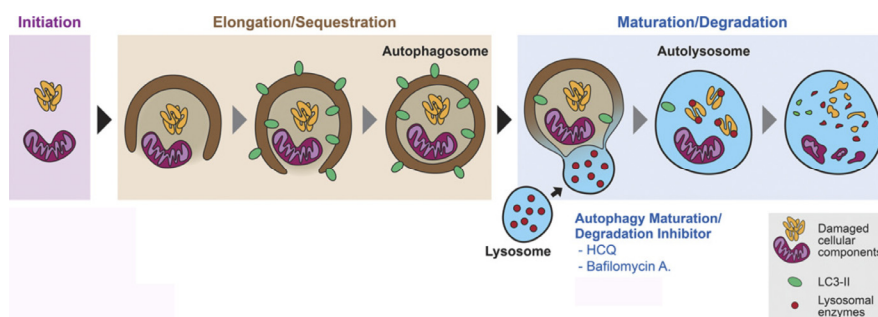


Figura 8. Proceso de autofagia en células de mamífero.

4.1.3. Necrosis y Necroptosis

El último tipo de muerte celular conocido es la muerte celular necrótica o necrosis. Este tipo de muerte puede producirse cuando el daño es letal o se produce de manera accidental. La necrosis es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo, cuyo origen es una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica, la cuál mediante mecanismos de adaptación ó de resistencia no puede ser reparada. La necrosis puede producirse debido a agentes nocivos, o condiciones fisiológicas determinadas, como isquemia, hipoxia, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicas, por una infección o por el desarrollo de

una enfermedad autoinmune . Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento ya que como característica morfológica, se presenta un hinchamiento celular en los orgánulos y el citoplasma, se deterioran las estructuras celulares, y se paralizan funciones críticas para la vida. La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos [150].

Otro tipo de muerte dentro del término general de necrosis es la necroptosis, que se desarrolla en similares condiciones que la necrosis pero de una forma programada [134]. Este tipo de proceso ocurre cuando existe una inhibición de las caspasas ó, si existe una mutación en los genes que codifican para las caspasas o en los de otras proteínas involucradas en la ruta de apoptosis. La necroptosis puede inducirse específicamente mediante señales emitidas desde la membrana, a través de la unión de los receptores de muerte TNFR a su ligando , y está regulada por mecanismos de señalización intracelular a través de una cascada de quinasas. La proteína quinasa RIP-1, que contiene el dominio de muerte (DD) [151, 152], se desplaza a la mitocondria generando en ella una disfunción y a su vez un incremento en la producción de ROS [153] y una activación de JNK (Figura 8).

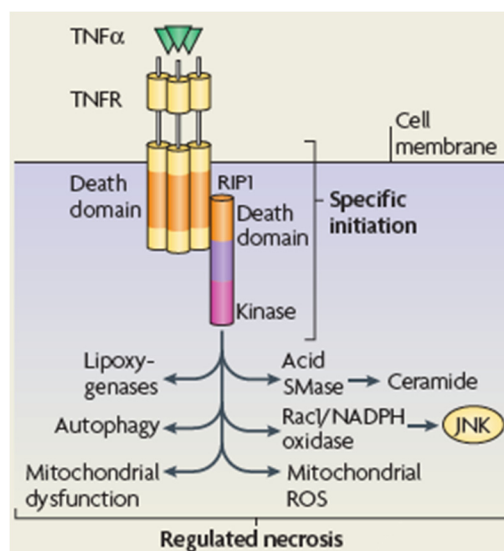


Figura 9. Necrosis regulada o necroptosis. La activación de RIP1 incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) desde la mitocondria y activa JNK, la cuál puede ser clave para la ejecución de la muerte celular necrótica en algunos tipos de células. Imagen tomada de [134].

5. Lípidos antitumorales

La edelfosina es un compuesto perteneciente a de una familia de alquilfosfolípidos (APLs) conocidos como lípidos antitumorales (ATLs). Los lípidos antitumorales (ATLs) son compuestos sintéticos con una estructura semejante a los Fosfolípidos.

5.1 Historia, origen y estructura.

El primer compuesto ATL fue sintetizado en los años 60, como análogo de la lisofosfatidilcolina, ya que se buscaba la síntesis de compuestos que presentaran actividad inmunomoduladora en macrófagos [154].

Han sido descritas otras aplicaciones de los ATLs, como su actividad antiparasitaria y antiprotozoaria, mostrando una potente actividad frente a la leishmaniasis [155, 156]. Entre los distintos ATLs, la miltefosina se ha utilizado para el tratamiento de la metástasis cutánea de cáncer de mama bajo el nombre comercial de *Miltex* [157].

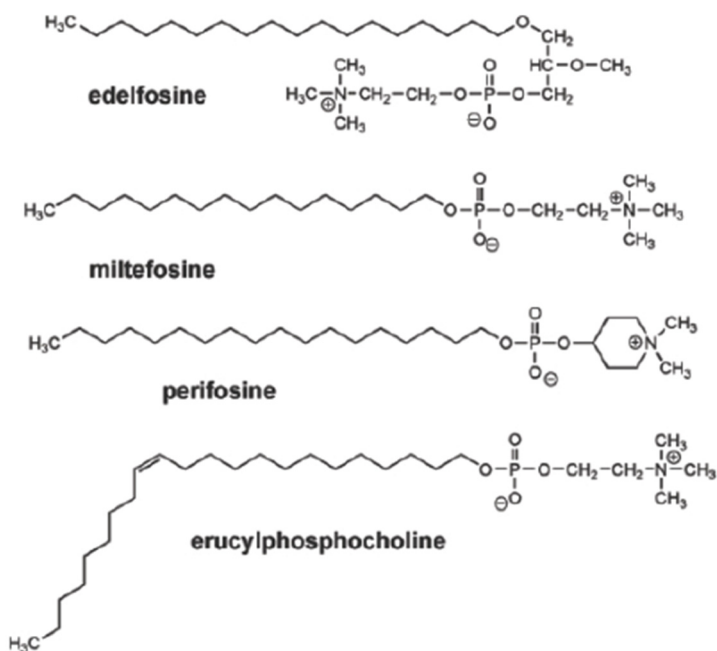


Figura 10 . Estructura química de algunos ATLs. Imagen tomada de [156].

5.2 Mecanismo de acción de los ATLS y vías de señalización implicadas

La edelfosina interacciona con las membranas biológicas induciendo toxicidad y alterando diversos procesos celulares, puesto que tiene una naturaleza de tipo lipídico [154, 158]. En varios estudios llevados a cabo, se ha demostrado cuales son las posibles dianas que los ATLS podrían tener dentro de la célula, y se ha determinado que todas esas dianas se encuentran relacionadas con la membrana celular, en la síntesis de sus componentes estructurales, así como de la alteración en sus funciones, y finalmente la apreciación de efectos en otros organelos celulares.

5.2.1 Efecto sobre el metabolismo lipídico

Ha sido descrito que los compuestos ATLS se acumulan tanto en la membrana plasmática como en las membranas intracelulares. Presentan una elevada capacidad de inhibición en la síntesis de fosfatidilcolina, afectando además la síntesis de moléculas lipídicas participantes en la señalización celular en la membrana [159-161].

5.2.2 Estrés en el retículo endoplásmico

Los ATLS parecen tener acción sobre el retículo endoplásmico en la inducción de apoptosis que éstos compuestos generan en la célula, lo anteriormente dicho está sustentado en diversos estudios llevados a cabo, en donde las observaciones han demostrado que análogos fluorescentes de la edelfosina se acumulan en este compartimento celular. También se ha sugerido que los ATLS inducen estrés a través de su incorporación a las membranas del RE y al desequilibrio en el calcio acumulado en su interior [159, 162].

Cuando el estrés generado se presenta de manera continuada, la apoptosis es inducida a través de la activación de caspasas y la participación de la mitocondria [159, 163].

5.2.3 Efecto de los ATLS sobre las vías de señalización

Diversos estudios han sugerido que los ATLS inhiben la función de la proteína quinasa C (PKC). Éstas proteínas son importantes puesto que participan en la regulación de otras a través de su fosforilación. También se ha descrito que la

proteína quinasa C activada mediante análogos del diacilglicerol (DAG), lleva a la progresión tumoral [164].

La edelfosina inhibe la activación de la fosfolipasa C (PLC) [165] cuya actividad genera lípidos mensajeros como el DAG y el inositol-1,4,5-trifosfato. Puesto que DAG es un activador de la PKC, es probable que la inhibición de ésta podría estar causada en parte por la inhibición de la fosfolipasa C. Además se ha descrito que la edelfosina inhibe la liberación de inositol-1,4,5-trifosfato [166] el cual induce la liberación del calcio intracelular.

Otras vías de señalización que son afectadas por el mecanismo de acción la edelfosina, son la inactivación de la ruta ERK1/2 que participa en proliferación y supervivencia, probablemente porque la edelfosina inhiba la interacción Ras-Raf, ya que impide la translocación hacia la membrana de Ras/GRP y Raf-1 [167].

AKT es otra ruta que también se ve afectada por el efecto de los ATLs, y se han llevado a cabo estudios en donde se describe que el ATL muestra una elevada capacidad de inactivar AKT [168], ya que inhibe la asociación de ésta a la membrana plasmática, lo cual es un evento clave para su fosforilación en los residuos Ser472 y Thr 308 [168, 169].

La edelfosina también puede activar otras rutas como la de MAPKs activando la vía de SAPK/JNK, tanto en tumores sólidos como hematológicos [159, 170], activación que se lleva a cabo mediante estímulos de estrés como la elevada producción de ROS intracelulares y el estrés en el retículo endoplásmico.

En estudios que se han realizado en nuestro grupo se describe que la edelfosina activa la ruta de apoptosis mediante el reclutamiento de proteínas en microdominios de membrana denominados lipid rafts [163, 171, 172].

En relación a esto, se ha descrito el reclutamiento del receptor de muerte Fas/CD95 y su activación independiente de la unión a su ligando FasL en los microdominios de membrana, activando así la ruta extrínseca de la apoptosis [163, 171-173].

Capítulo 2. OBJETIVOS

1. Estudiar el mecanismo de acción de los ATLs en distintas líneas celulares de cáncer de hígado. Comprobar su posible papel como inductor de apoptosis.
2. Dilucidar la activación de la maquinaria apoptótica analizando las moléculas implicadas en la señalización de la apoptosis en cáncer de hígado, inducido por el tratamiento con edelfosina
3. Analizar los efectos de la hipoxia fisiológica e inducida en la muerte celular producida por edelfosina
4. Estudiar el papel de la edelfosina tanto en la formación como en la muerte de estructuras hepatoesferas formadas a partir de líneas tumorales de cáncer de hígado.

Capítulo 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo de tesis fueron adquiridas en la **European Collection of Cell Cultures (ECACC)**

Líneas de hepatocarcinoma

Línea celular **HepG2** (human caucasian hepatocellular carcinoma cat. 85011430 ECACC)

Línea celular **PLC/PRF/5** (human liver hepatoma, Alexander cell line cat. 85061113 ECACC)

Línea celular **Huh7** (human hepatocellular carcinoma cat. 01042712 ECACC)

Línea de carcinoma cervicouterino

Línea celular **Hela** (human cervix carcinoma)

3.1.2 Cultivos celulares

Medios de cultivo

Medio de Cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Suero Fetal Bovino inactivado, Penicilina (1000 UI/mL), Estreptomicina (1000 µg/mL), L-Glutamina (200mM), Tripsina/EDTA 0.05% de rojo fenol, obtenidos de GIBCO-BRL Life Technologies (Gaithersburg, MD, EE.UU).

Tampón Fosfato Salino (PBS 1X Na⁺/K⁺): KCl 0.02%, NaCl 0.8%, KH₂PO₄ 0.02%, Na₂HPO₄ 0.11%.

Medio de cultivo para células stem: DMEM/F12 sin suero, Nutrient Mixture (Invitrogen), 2% v/v B27, 20 ng/mL Recombinant Human EGF (invitrogen), 20 ng/mL Recombinan Human FGF Basic AOF (Invitrogen), 4 µg/µl Insulina (Sigma), Penicilina (1000 UI/mL), Estreptomicina (1000 µg/mL), L-Glutamina (200 mM),

3.1.3 Lípidos antitumorales evaluados

Edelfosina (EDLF) (1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-rac-glicer o-3-fosfocolina)(R. Berchtold, Biochemisches Labor, Bern, Suiza); perifosina (PERIF) (octadecil-(1,1-dimetil-riperidinio-4-il)-fosfato) (Zentaris, Frankfurt, Alemania); miltefosina (MILTEF) (hexadecilfosfocolina) (Calbiochem, Cambridge, MA, EE.UU); erucilfosfocolina (ERPC) ((13Z)-docos-13-en-1-il-2-(trimetilamonio)etil fosfato) (Zentaris, Frankfurt, Alemania).

3.1.4 Anticuerpos

Se emplearon los anticuerpos indicados en la siguiente tabla:

Tabla 8. Anticuerpos Utilizados.

ANTICUERPO	COMPAÑÍA	ORIGEN	PESO MOLECULAR (kDa)	DILUCION
Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E)	Cell Signaling Technology	Rabbit	17, 19	1:1000
PARP (Poly(ADP-Ribose) Polimerase)	BD Pharmingen	Mouse	116, 85	1:1000
Anti β -Actin, Monoclonal (clone AC15) Mouse Ascite Fluid	Sigma	Mouse	42	1:1000
Caspasa-4 p20 (N-15): sc-1220, Polyclonal	Santa Cruz Biotechnolgy	Goat	Proforma 50 Activa 20	1:500
CHOP (L63F7) Mouse mAb	Cell Signaling Technology	Mouse	27	1:1000
BAP 31 (C-15): sc-18579	Santa Cruz Biotechnology	Goat	29/31	1:500
Phosfo eif2 α (Ser51) (119A11)	Cell Signaling Technology	Rabbit	38	1:1000
eIF2 α	Cell Signaling Technology	Rabbit	40	1:1000
GRP 78 (H129); sc 13968	Santa Cruz Biotechnology	Rabbit	78	1:1000
Cleaved Caspase-9 (Asp330) (D2D4) Rabbit mAb #7237	Cell Signaling Technology	Rabbit	37, 17	1:1000
Anti-Cytochrome C	BD Pharmingen	Mouse	15	1:1000
p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)(G9),	Cell signaling	Rabbit	46, 54	1:1000

Monoclonal	Technology			
JNK2	Cell Signaling Technology	Rabbit	54	1:1000
P44/42 MAPK (Erk 1/2) Antibody	Cell Signaling Technology	Rabbit	42, 44	1:1000
Erk 2 (D-2): sc-1647, Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	Mouse	42,44	1:1000
p-AKT (Ser 473), Monoclonal	Cell Signaling Technology	Rabbit	60	1:1000
p-AKT (Thr 308), Monoclonal	Cell Signaling Technology	Rabbit	60	1:1000
AKT (pan) (11E7) Rabbit mAb #4685	Cell Signaling Technology	Rabbit	60	1:1000
Beclin-1 (D40C5), Monoclonal	Cell Signaling Technology	Rabbit	60	1:1000
LC3B, Monoclonal	Cell Signaling Technology	Rabbit	14,16	1:1000
F-168 anti 30 kDa human CHOP/GADD153 Polyclonal	Cell Signaling Technology	Rabbit	30	1:1000
Donkey anti Rabbit igG-HRP: sc-2317	Calbiochem	Rabbit		1:1000
Rabbit anti Mouse igG-HRP sc-358914	Santa Cruz Biotechnology	Rabbit		1:2000
Rabbit anti Goat igG-HRP: sc-2768	Santa Cruz Biotechnology	Mouse		1:2000
Mouse Anti-human FITC CD34	BD Biosciences	Mouse		
APC Mouse Anti-human CD44	BD Biosciences	Mouse		
Anti-EpCAM FITC	Becton Dickinson			
PE-Rat Anti-human DC184 CXCR4 fusin	Becton Dickinson	Rat		
PE Mouse Anti-human CD24	BD Pharmingen	Mouse		
APC-Mouse Anti-Human CD90	BD Pharmingen	Mouse		

3.2 METODOS

3.2.1 Cultivos celulares

El cultivo de células se realizó a 37°C en atmósfera humidificada, 5% de CO₂, y 98% de humedad relativa. Las líneas de carcinomas hepáticos HepG2, PLC/PRF/5 y Huh7, se cultivaron en medio DMEM, al igual que la línea de carcinoma de cervix humano HeLa, y se suplementaron con un 10% de suero fetal bovino (previamente inactivado a 56°C durante 45 min), 2 mM de L-Glutamina, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina.

3.2.1.1 Preparación de solución Stock de edelfosina

Se disolvió edelfosina en polvo en medio de cultivo RPMI-1640 completo (10% FCS, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina) hasta una concentración final de 1 mM. A continuación, la solución fue incubada 45 min a 50°C, esterilizada mediante filtración, y mantenida a 4 °C hasta su posterior utilización.

3.1.1.2 Criopreservación de líneas celulares

Las células se congelaron después de dividirse en fase de crecimiento exponencial, se levantaron de la placa con trisina 0.05%, se centrifugaron a 1200 rpm, posteriormente fueron lavadas con PBS y centrifugadas nuevamente. Una vez centrifugadas se resuspendieron en medio de congelación. Se enfriaron previamente los criotubos, se añadieron las células y se trasladaron en hielo rápidamente a -20°C. Pasadas 24 h se trasladaron en hielo seco a un congelador a -80°C , donde fueron almacenadas antes de pasar definitivamente a tanques de N₂ líquido a -196°C .

3.2.1.3 Pretratamientos con los distintos inhibidores

Todos los inhibidores se incubaron 1 h previamente antes de aplicar los correspondientes tratamientos con edelfosina a las concentraciones indicadas en la siguiente tabla:

Tabla 9. Inhibidores utilizados en el tratamiento de las líneas celulares de cáncer de hígado.

Inhibidor	Concentración utilizada
AKT III	10 µM
AKT VIII	10 µM
AKT X	5 µM

Bafilomicina	10 nM
BAPTA-AM	10 μ M
Cloroquina	20 μ M
SP600125	20 μ M
U0126	10 μ M
z-LE(OMe)HD (OMe)---fmk (z---LEHD-- -fmk, inhibidor irreversible)	50 μ M
Z-VAD-fmk	50 μ M

3.2.2 Cultivos celulares en condiciones de hipoxia

El cultivo de células se realizó a 37°C en atmósfera humidificada, 5% de CO₂, y 98% de humedad relativa, ajustando la cantidad de oxígeno en el ambiente al 1%, en un incubador Heracell™ 150i and 240i CO₂ o bien induciendo hipoxia con el compuesto DFO (deferoxamine mesylate salt) (Sigma), añadiendolo directamente al medio de cultivo, a una concentración de 300 μ M.

3.2.3 Cultivo de líneas celulares y análisis de la actividad apoptotica de la edelfosina

Las líneas celulares de hepatocarcinoma fueron sembradas en placas de 6 pocillos, a una concentración aproximada de entre 250,000 y 300,000 células, a las 24 horas se verificó la confluencia, y aproximadamente cuando estaba al 70% se añadió el ATL a las diferentes concentraciones (10, 20 y 30 μ M), durante los distintos tiempos de tratamiento (24, 48, y 72 h). Durante el tiempo de duración del tratamiento se hizo un seguimiento visual por microscopia óptica a las células para evaluar su aspecto y estado, antes de ser recogidas. Posteriormente se tripsinizaron y se recogieron en un tubo de citómetro (12 x 75 mm), se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante y el pellet de células fue resuspendido en etanol al 70%. Fueron incubadas durante 24 horas a 4°C

3.2.4 Análisis de apoptosis y ciclo celular mediante citometría de flujo

Las células tratadas que posteriormente fueron fijadas en etanol al 70%, fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue aspirado, y se lavaron 3 veces con 500 microlitros de PBS (KCl 0.2%, NaCl 0.8%, KH₂PO₄ 0.02%, Na₂HPO₄ 0.11%), centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos entre cada lavado, luego fueron resuspendidas en una solución de RNAsa A y yoduro de

propidio en PBS1X a una concentración de 1 mg/mL y 20 µg/mL respectivamente, e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad.

La proporción de células en cada fase del ciclo celular se determinó por medio de citometría de flujo en un equipo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), y la cuantificación de células apoptóticas se realizó mediante el cálculo del porcentaje de células en la región sub-G1 (hipodiploidía) en el análisis del ciclo celular con el software FCS Express 4 Research Edition.

3.2.5 Permeabilización de la membrana plasmática por incorporación de yoduro de propidio

Para medir la permeabilización de la membrana plasmática se cuantificó la incorporación de yoduro de propidio en células vivas. Las células previamente tratadas con edelfosina a las concentraciones y tiempos indicados, fueron levantadas de las placas con tripsina 0.05%, se centrifugaron a 1500 rpm y se lavaron con PBS, fueron resuspendidas en una solución de IP 1mg/mL en PBS, e incubadas durante 15 minutos a RT en oscuridad, posteriormente fueron analizadas observando los cambios en la intensidad de fluorescencia mediante citometria de flujo (FACScalibur) utilizando el programa CellQuest (Becton Dickinson).

3.2.6 Análisis de calcio citoplasmático por medición de fluorescencia (Fluo-4)

Se cultivaron 5×10^5 células en placas de 6 pocillos, y se trataron con EDLF a las concentraciones indicadas (HepG2, 20 µM; PLC/PRF/5, 30 µM; y Huh-7, 30 µM) durante 1 h. Posteriormente, se marcaron las células con la sonda Fluo-4 (quelante de calcio) a una concentración de 20 µM y se dejó incubar durante 15 min. Se marcaron tanto las células tratadas como sin tratar con EDLF. La intensidad de florescencia se cuantificó mediante citometría de flujo (Becton Dickinson FACScalibur).

3.2.7 Analisis de liberacion de citocromo c mitocondrial

Para analizar la liberación de citocromo c desde la mitocondria se utilizaron diferentes tampones de lisis para obtener las fracciones mitocondriales (FM) y citosólicas (FC) [162]. Se trataron 1×10^7 células de cáncer de hígado con EDLF a la concentración indicada y a distintos tiempos (24 y 28 h). Las células fueron levantas de las placas de cultivo con tripsina 0.05% y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con 50 µL de tampón de lisis (sacarosa 250uM, EDTA 1 mM, digitonina 0.05%, Tris 25

mM pH 6.8, DTT 1mM, aprotinina y leupeptina 1 µg/mL, PMSF 0.1 mM), se incubó durante 30 segundos a 4°C y a continuación se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min. Se separó el sobrenadante obteniendo la fracción citosólica (FC) y el pellet correspondía a la fracción mitocondrial y nuclear (FMN). La FMN se resuspendió rápidamente con 50 µL de tampón de lisis y posteriormente se realizó una microncentrifugación con el fin de precipitar los núcleos. El sobrenadante correspondió a la pre-fracción mitocondrial (PFM). A la PFM obtenida, se le realizó otra microcentrifugación corta de 10 segundos para precipitar los núcleos restantes, obteniendo, obteniendo finalmente la fracción mitocondrial (FM). La FM se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min a 4°C para precipitar las mitocondria, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 20 µL de tampón de lisis. Los extractos citosólicos obtenidos se cuantificaron por el método del reactivo Bradford y se analizaron por western blot para la identificación del citocromo c liberado al citosol.

3.2.8 Medición del potencial de membrana mitocondrial y producción de especies reactivas de oxígeno

Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial de las células en respuesta a los tratamientos fue determinado utilizando DiOC6 (3,3'-dihexyloxacarbocyanine-iodide, fluorescencia verde; Molecular Probes, Leiden, Países Bajos) y para determinar ROS se utilizó DHE (ó HE, dihydroethidium, fluorescencia roja después de su oxidación; Sigma). 2.5×10^5 células de cada línea celular fueron tratadas con EDLF a distintos tiempos, posteriormente las células fueron despegadas de las placas de cultivo con tripsina 0.05%. Fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos, posteriormente se resuspendieron en 400 µL de PBS conteniendo 20 nM DiOC6 y 2 mM de HE. Tras una incubación a 37°C de temperatura durante 20 min, las muestras se analizaron inmediatamente por citometría de flujo (Becton Dickinson FACSCalibur).

3.2.9 Western blot, e inmunodetección

Luego del tratamiento de las células de las diferentes líneas celulares en estudio con EDLF a los tiempos indicados, las células se trataron con tripsina 0.05% y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min. A continuación, se lavaron con PBS y se centrifugaron a la misma velocidad y tiempo. Posteriormente, el pellet de células fue lisado con 60 µL de tampón WCE 300 (HEPES (pH 7.7) 25 mM, NaCl 0.3 M, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, Triton X-100 0.1%, β-glicerofosfato, 0.1 mM ortovanadato sódico), suplementado con inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 20 µg/mL aprotinina, 20 µg/mL leupeptina). Tras una agitación vigorosa y la

posterior incubación en hielo durante 20 min, las proteínas solubilizadas se obtuvieron por centrifugación a 14000 rpm, 20 min, 4°C.

La medida de la concentración proteica se realizó mediante el método Bradford, método colorimétrico basado en la reacción del colorante azul de Coomassie G-250 al unirse a proteínas. Se utilizó la solución comercial Kit Protein Assay (BioRad, Richmond, CA, USA), y la cantidad de proteínas totales de cada muestra se determinó mediante la interpolación de las absorbancias obtenidas en una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) de Sigma.

Se utilizaron entre 30 y 50 µg de proteína, las cuales fueron desnaturalizadas mediante una incubación de 5 min a 95°C en tampón Laemmli (2% dodecilsulfato sódico (SDS), 10% glicerol, 140 mM β-mercaptoetanol, 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 0,01% azul de bromofenol), y sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Una vez separadas en función de su peso molecular, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) utilizando como tampón de transferencia 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% (v/v) metanol.

Tras eliminar los restos de metanol mediante un lavado con tampón TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20), las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada al 5% (p/v) en TBS-T durante 60 min a temperatura ambiente, y durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios que se detallan en la tabla 1. Después de realizar 3 lavados de 5 min con TBS-T, se procedió a la incubación de las membranas con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP), durante 1h a temperatura ambiente en agitación. Tras los correspondientes lavados con TBS-T, se incubaron durante 2 min con el sustrato de ECL (enhanced chemiluminescence) de inmunodetección en filtro (Amersham Biosciences), y el peso molecular de las proteínas en estudio se calculó utilizando marcadores estándar de peso molecular conocido (Kaleidoscope Prestained Standards, BioRad).

3.2.10 Formación de hepatoesferas

Se eligió la línea celular PLC/PRF/5 para la obtención de esferas. Una vez crecidas las células en medio de cultivo con suero, fueron levantadas de la placa con tripsina 0.05%, y lavadas dos veces con DPBS sin calcio ni magnesio (GIBCO), a 1200 rpm durante 5 min, y posteriormente fueron contadas con cámara de Neubauer. Se sembraron 1.0×10^6 células de la línea a partir de la cual se fuesen a formar las esferas (PLC/PRF/5), en medio de cultivo de stem cells: DMEM/F12 sin suero, Nutrient Mixture (Invitrogen), 2% v/v B27, 20 ng/mL recombinant human EGF (invitrogen), 20 ng/mL recombinan human FGF basic AOF

(Invitrogen), 4 µg/µl Insulina (Sigma), penicilina (1000 UI/mL), estreptomina (1000 µg/mL), L-glutamina (200 mM), las células fueron colocadas en un flask de baja adherencia (Corning® Ultra-Low attachment cell culture flasks), de 75cm³, y colocadas en un incubador a 37°C. Las células fueron observadas cada día, y cada día fueron agregados los factores de crecimiento, 20ng/mL recombinant human EGF (Invitrogen), 20 ng/mL recombinant human FGF basic AOF (Invitrogen).

3.2.11 Disgregación de hepatoesferas

Al observar las hepatoesferas y considerar que debían ser disgregadas para su renovación (al llegar a 7 días o bien alcanzar las 100 micras de diámetro aproximado), fueron aspiradas cuidadosamente de la placa de cultivo y centrifugadas en un tubo Falcon de 50 mL durante 2 min a 800 rpm. Luego fue aspirado el medio con cuidado de no aspirar el pellet de esferas. Se añadieron de 2 a 3 mL de DPBS (GIBCO) sin calcio ni magnesio, y fueron centrifugadas por 2 min a 800 rpm. El DPBS fue aspirado y el pellet de esferas fue resuspendido en 500 µL de StemPro®Acutase® (Cell dissociation reagent, Gibco Life Technologies) con ayuda de una micropipeta de 1 mL y una punta azul, incubándose a 37°C durante un tiempo máximo de 10 min. Se añadieron 4 mL de DPBS (GIBCO) para inactivar el reactivo de disgregación y se centrifugó durante 2 minutos a 800 rpm, se aspiró el sobrenadante con cuidado de no tocar el pellet y se añadió nuevamente DPBS, se centrifugó a 800 rpm durante 2 min, fue aspirado el sobrenadante y finalmente el pellet de esferas disgregadas fue resuspendido en medio de cultivo de stem cells (DMEM/F12 sin suero, Nutrient Mixture (Invitrogen), 2% v/v B27, 20 ng/mL Recombinant Human EGF (Invitrogen), 20 ng/mL Recombinant Human FGF Basic AOF (Invitrogen), 4 µg/µl Insulina (Sigma), Penicilina (1000 UI/mL), Estreptomina (1000 µg/mL), L-glutamina (200 mM). Las esferas disgregadas (single cells) resultantes podían ser contadas, criopreservadas, o pasadas a medio de cultivo nuevo.

3.2.12 ensayo de clonogenicidad (formación de colonias de células stem en agar)

En placas de 6 pocillos se colocaron 500 µL de medio de cultivo para células stem suplementado con agar al 0.6%, y se dejó solidificar a temperatura ambiente, dentro de la campana de flujo laminar. Se levantaron las células del flask de cultivo, se disgregaron y se tomaron 5,000 células por pocillo, se resuspendieron en medio de cultivo para Stem Cells suplementado con agar al 0,33%, y se añadió 1 mL de suspensión de células sobre la capa de agar al 0,66%.

Cada pocillo fue preparado con una concentración de edelfosina distinta (1 nm, 10 nm, 100 nm, 1 μ M y 10 μ M), la cual fue añadida al medio suplementado con agar antes de ser solidificado. Tras 10 días de incubación se realizó el conteo de

3.2.13 Inmunocitoquímica

las colonias formadas, contándose aquellas que fueron mayores a 100 micras. Se crecieron las esferas en medio para stem cells, una vez que tuvieran un tamaño aproximado de 100 micras, se recogieron y se pasaron a través de un filtro de 40 μ m de diámetro, las esferas que quedaron adheridas a la parte de adentro del filtro fueron lavadas con 6-10 mL de medio para células stem y colocadas en un tubo Falcon de 50 mL. Se llevaron a una placa de Petri para observar la densidad de esferas por mL y determinar la cantidad de volumen de esferas que se utilizaría para que quedaran distribuidas de manera uniforme en las placas de polilisina. De acuerdo a la densidad que se observó, se tomaron 200 μ L de esferas resuspendidas en el medio para cada anticuerpo que fuese utilizado. Se siguió el protocolo del equipo cytospin para adherir las células a una lámina de cristal, tratada con polilisina. Se centrifugaron a una velocidad de 800 rpm durante 2 minutos, y una vez terminado el tiempo de centrifugación las láminas se observaron al microscopio para verificar la densidad de esferas, y fueron dejadas secar a temperatura ambiente durante 1 hora. Se fijaron las esferas en una solución de formaldehído al 4% en PBS, sin trazas de metanols. Se colocaron 100 μ L de formaldehído justo por encima de la gota seca en donde se concentraron las esferas, se colocaron las láminas en una cámara húmeda y protegida de la luz a 4°C durante 20 minutos. Una vez finalizada la fijación con el formaldehído se lavaron las láminas en un frasco tipo “coplin” con PBS durante 5 minutos. Se permeabilizaron las esferas con TWEEN 0.1%-PBS durante 5 minutos, para ello se llenó el frasco tipo “coplin” con 50-70 mL de TWEEN 0.1%-PBS, se sumergieron las láminas con las esferas y se dejaron 5 minutos de incubación a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo se lavaron las láminas con 50-70 mL de PBS durante 5 minutos. Las láminas con las esferas fijadas fueron incubadas con los anticuerpos respectivos, (una lámina por cada anticuerpo) realizándose la dilución indicada por cada fabricante, se colocaron los anticuerpos correspondientes sobre las láminas con las esferas y se dejaron incubando durante toda la noche. Pasado el tiempo de incubación, las láminas fueron lavadas durante 5 minutos en PBS y se montaron directamente los cubreobjetos sobre los portaobjetos con medio de montaje con DAPI.

3.2.14 Ensayo anexina V/yoduro de propidio

Se siguió el protocolo del fabricante del kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I BD Pharmingen™. Brevemente, las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío, luego fueron resuspendidas en el buffer de unión 1X (0.1 M Hepes/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl₂), a una densidad de 1×10^6 células/ml. Se tomaron 100 μ l de la solución (1×10^5 células) y se colocaron en un tubo de citómetro. Se añadieron 5 μ L de Anexina V unida a FITC y 5 μ L de yoduro de propidio. Se resuspendieron suavemente y fueron incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad. Se añadieron 400 μ l de buffer de unión 1X perteneciente al kit utilizado a cada tubo y se analizaron al citómetro dentro de la siguiente hora.

3.2.15 Extracción de RNA

Se siguió el protocolo de extracción del kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La concentración y la pureza del RNA aislado fue determinada por Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) para asegurarse de que fuese de alta pureza.

3.2.16 Diseño del microarray

Se utilizó el microarray **GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array** (Affymetrix), que contiene 36 079 referencias de genes, de los cuales 32,020 cuentan con una anotación conocida.

La información completa puede ser revisada en:

- http://www.affymetrix.com/catalog/131453/AFFY/Human+Gene+ST+Arrays#1_1
- <http://hgdownload.cse.ucsc.edu/downloads.html#human>

3.2.17 Analisis bioinformático

Mediante un programa en lenguaje R se utilizaron los paquetes de Bioconductor para ejecutar los diferentes algoritmos. La normalización y el cálculo de señal se hacen mediante el algoritmo RMA (Robust Microarray Analysis) y el cálculo de expresión diferencial mediante SAM (Significance Analysis of Microarrays), que incluye una estimación del error con el algoritmo FDR (False Discovery Rate). Todas las referencias de estos algoritmos se encuentran en el apartado de resultados.

Capítulo 4: RESULTADOS.

Sección 1: Caracterización de la muerte celular

4.1 Análisis apoptótico de las líneas de cáncer de Hígado mediante ciclo celular, generada por el compuesto EDLF y otros ATLs

En los experimentos realizados en las líneas tumorales de hígado HepG2, Huh7, y PLC/PRF/5, se determinó el porcentaje de apoptosis inducido por edelfosina mediante análisis de ciclo celular y conteo de la población Sub G0-G1, por medio de citometría de flujo. Se observó que en las diferentes líneas, el porcentaje de población Sub G0-G1 o apoptótica, aumentó progresivamente en el tiempo, y también respecto a la concentración de edelfosina utilizada. En el caso de la Línea HepG2, se detectó que la concentración de 20 μ M de edelfosina a las 24 horas de tratamiento fue la más eficiente, con el 25% de muerte, haciendo notar que dicho porcentaje se vio incrementado en el tiempo de duración del tratamiento. Para la línea Huh7, se encontró que la concentración más eficiente fue la de 30 μ M, con aproximadamente un 25% de muerte a las 24 horas de tratamiento. En el caso de la línea PLC/PRF/5, se observó un bajo efecto toxico de la edelfosina en las células, ya que solamente a concentraciones mayores a 40 μ M se observó un porcentaje superior al 15% en la muerte, siendo también evidente este aumento también fue dependiente del tiempo de exposición al fármaco edelfosina.

Se realizó un ensayo comparativo entre distintas dosis de edelfosina para saber si la apoptosis inducida por el compuesto era dependiente de la concentración utilizada, para ello tratamos las líneas celulares HepG2, Huh7 y PLC/PRF/5 a distintas concentraciones de edelfosina (10, 20, 30, 40 y 50 μ M) a 24 horas de tratamiento para todas las concentraciones.

En la Figura R1 se observó que para la línea tumoral HepG2, la concentración mínima eficiente fue la de 20 μ M, en el caso de la línea Huh-7 aunque existe una similitud entre la efectividad de 20 y 30 μ M de concentración de edelfosina, decidimos utilizar a lo largo de todo este trabajo la concentración más alta, que aunque se encuentra fuera del rango de concentración encontrada en ensayos *in vivo* previamente realizados en nuestro grupo, con concentraciones en plasma entre 10 y 20 μ M [174, 175], es muy probable que acortando el tiempo de tratamiento se observe el mismo resultado que con la dosis más baja si se prolongara el tiempo de exposición.

Resultó evidente que en la línea PLC/PRF/5, se observó una resistencia al compuesto edelfosina, aunque se decidió utilizar la concentración de 30 μ M

para realizar todos los ensayos de este trabajo de forma comparativa en las distintas células empleadas.

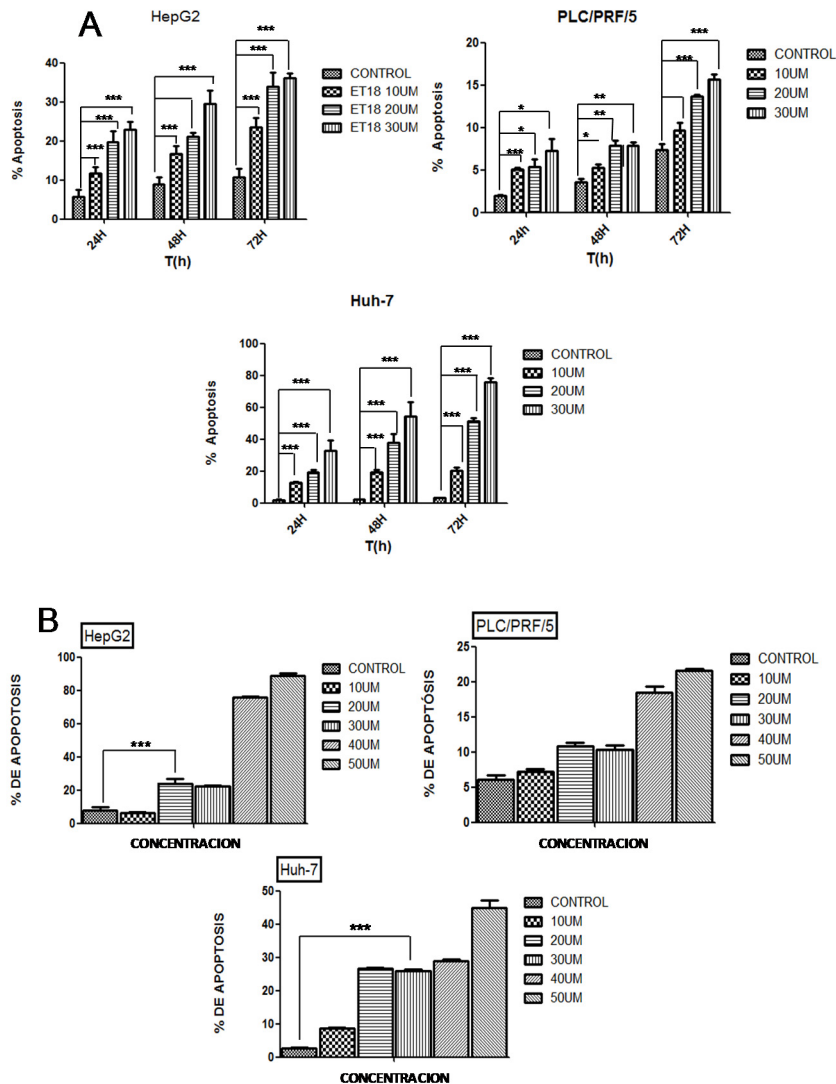


Fig R1 . Análisis de la actividad apoptótica de la edelfosina en las distintas líneas de cáncer de hígado. A. Mediante citometría de flujo fue cuantificado el porcentaje de apoptosis generada por el compuesto edelfosina, a distintas concentraciones (10, 20 y 30μM) y a diferentes tiempos de tratamiento (24, 48 y 72 horas), los datos de porcentaje de apoptosis fueron comparados con respecto a células control sin tratamiento. **B.** Estudio comparativo de la citotoxicidad del compuesto edelfosina a distintas concentraciones, en un tiempo de 24h para todas ellas. Los datos obtenidos se compararon respecto a células control sin tratamiento. Los porcentajes de apoptosis son promedio de tres experimentos diferentes. +/- E.S. *** p<0.001** p<0.01 y *p<0.05 (Student's *t*---test).

También comparamos la respuesta de las líneas celulares de cáncer de Hígado HepG2, Huh-7 y PLC/PRF/5, al tratamiento con distintos lípidos antitumorales (ATLs), a diferentes concentraciones, (20 μ M, 30 μ M y 30 μ M respectivamente), debido a que en dosis más bajas no se observó una inducción de apoptosis significativa (Figura R2). Analizando los datos que se obtuvieron, concluimos que el compuesto ATL con el cual se observa una mayor actividad apoptótica fue la edelfosina, debido a que los resultados muestran un porcentaje de apoptosis del 19% para la línea HepG2, un 12% para PLC/PRF/5, y un 25% para Huh-7 tras 24 horas de tratamiento (Figura R2).

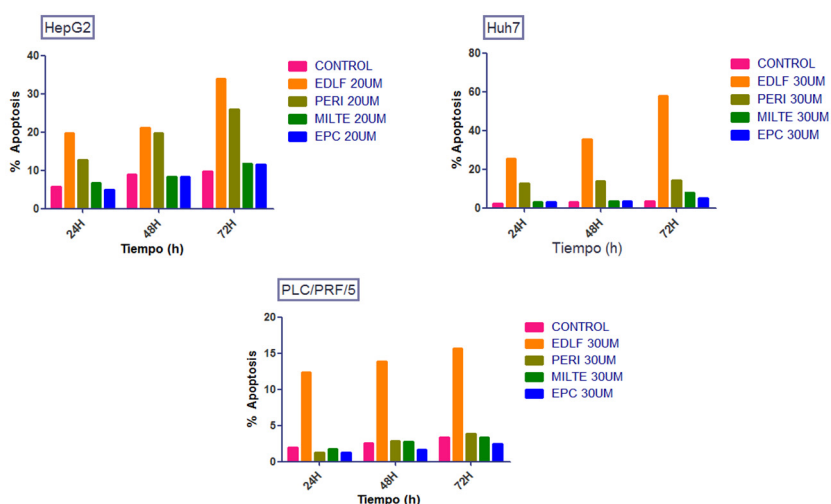


Fig R2. Estudio de la actividad apoptótica de los ATLs en líneas celulares de Cáncer de Hígado. El porcentaje de apoptosis fue determinado por medio de la cuantificación de la fase Sub G1 del ciclo celular mediante citometría de flujo.

Realizamos un estudio comparado de los cuatro ATLs (EDLF, PERI, MILTE, EPC) en las líneas HepG2 (20 μ M), Huh-7, y PLC/PRF/5 (30 μ M) a tiempo de 24h para las tres líneas celulares. El análisis es el resultado de un experimento representativo de dos realizados.

4.2 Implicación de las caspasas en la ruta de apoptosis en líneas de cáncer de hígado

Como se mostró en resultados anteriores, se observó que el compuesto edelfosina es el ATL con mayor actividad apoptótica en las líneas celulares. Como se ha hecho mención en la introducción, en la vía apoptótica participan una serie de proteínas de carácter fundamental que se encuentran involucradas

en la iniciación de dicha ruta. Es por ello que se evaluó la activación de la caspasa-3, así como la fragmentación de PARP (poli(ADP-ribosa)polimerasa), que actúa como sustrato de las caspasas-3 y 7, en las tres líneas de cáncer de hígado. Se observó, en las líneas celulares HepG2 y Huh-7 una activación de la caspasa-3 a partir de las 6 y 15 horas respectivamente, y en ambas líneas ésta actividad se encuentra mantenida hasta las 48 horas para el caso de la línea HepG2 y a las 24h para la línea Huh-7. Para el caso de la línea PLC/PRF/5, se observa claramente en la figura R3A, que no se presenta activación de la proteína caspasa-3, sugiriendo que probablemente en esta línea celular es otra u otras las rutas alternativas de muerte que se encuentran activadas.

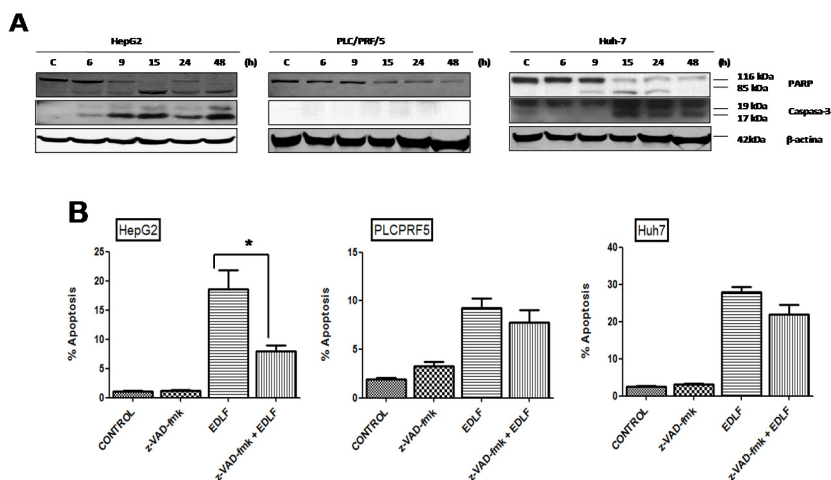


Figura R3. Participación de la caspasa ejecutora 3, en el proceso de apoptosis generado por el compuesto edelfosina en líneas celulares de cáncer de hígado.

A. Mediante la técnica de Western Blot, se estudió el efecto de la edelfosina sobre la activación de la caspasa-3. Se utilizó la proteína β -actina como control de carga para todos los western blot. **B.** Se inhibió la familia de las caspasas con el inhibidor z-VAD-fmk, a una concentración de 50 μ M, añadiéndolo 1 hora antes del tratamiento con edelfosina a la concentración establecida para cada línea celular, durante un tiempo de 24 h. El porcentaje de apoptosis fue determinado mediante citometría de flujo analizando el ciclo celular. La significancia del experimento se realizó comparando la inhibición con respecto a las células tratadas solamente con EDLF. Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes \pm E.S. * $p < 0.05$ (Student's t-test)

Con el objetivo de estudiar la implicación de las caspasas en el mecanismo de apoptosis generado por el compuesto edelfosina, se decidió inhibir a toda la familia de caspasas, utilizando el agente inhibidor pan-caspasa permeable a las células Z-VAD-fmk, el cual actúa uniéndose de manera irreversible al sitio catalítico de las proteínas caspasas, impidiendo así la inducción de la apoptosis.

EL resultado de los experimentos de inhibición (Figura R3B) mostró que en la línea HepG2 hay una reducción significativa en la población apoptótica, apoyando el hecho de que la caspasa-3 parece ejercer un papel importante en el mecanismo de muerte por apoptosis en esta línea celular, mientras que en las Líneas PLC/PRF/5 y Huh-7 no se mostró una disminución significativa en la inhibición de la apoptosis inducida por la edelfosina.

4.3 Evaluación de rutas de Muerte Alternativas a la apoptosis generada por EDLF líneas de cáncer de Hígado

Al existir mecanismos alternativos a la apoptosis en la muerte celular, se decidió realizar ensayos de viabilidad celular mediante la incorporación de yoduro de propidio (IP), permitiéndonos de esta manera identificar procesos necróticos o apoptóticos tardíos, basándonos en la integridad de la membrana celular.

Se observó que en las líneas de cáncer de hígado, para el caso de la línea HepG2, las células IP positivas a las 24 horas representan un porcentaje menor al 10%, mientras que a las 48h de tratamiento el porcentaje de células IP positivas aumentó hasta cerca del 20%.

Para el caso de las líneas Huh-7 y PLC/PRF/5, el número de células IP positivas, desde las 24 horas de tratamiento fue considerablemente más elevado respecto al control con células sin tratar, con porcentajes muy cercanos al 20% para el caso de la línea PLC/PRF/5 y del 35% para la línea Huh-7, y en ambas líneas, a las 48 horas de tratamiento con el ATL edelfosina, el porcentaje de células IP positivas fue de más del 40% (Figura R4).

Se analizó también el efecto de la inhibición de la apoptosis con el inhibidor de apoptosis z-VAD-fmk en la muerte inducida por el tratamiento con edelfosina y evaluado por incorporación de IP (Figura R5). La inhibición de la apoptosis produjo una disminución en la incorporación de IP en las tres líneas celulares ensayadas, aunque ésta no resultó ser significativa para el caso de las líneas PLC/PRF/5 y Huh-7 (Figura R5). No obstante en la línea HepG2, si que se observó una disminución estadísticamente significativa en la incorporación de IP respecto a aquellas células que solo fueron tratadas con edelfosina a las 24 horas de tratamiento (Figura R5).

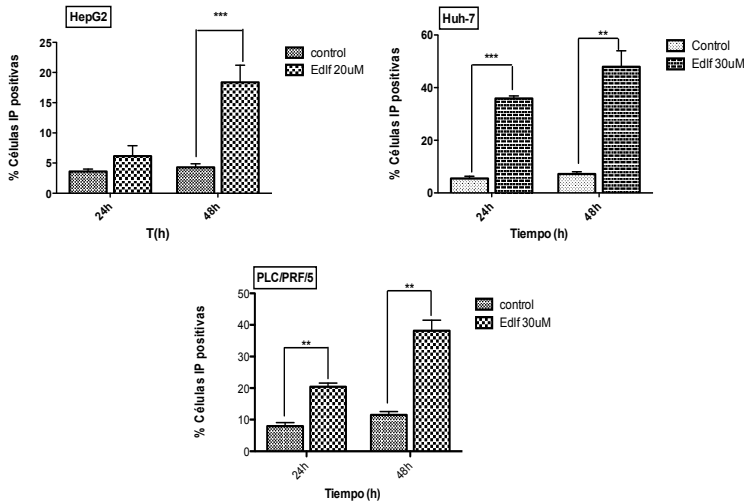


Figura R4. Análisis de la muerte celular por Incorporación de ioduro de Propidio (IP). Mediante un análisis por citometría de flujo, se analizó la integridad de la membrana de las células, para ello las células fueron lavadas con PBS y posteriormente marcadas con una solución de IP (1mg/mL) durante 5 minutos, y analizadas en el citómetro para determinar la señal de la fluorescencia emitida por el IP. Las células se trataron con edelfosina a la concentración y tiempos indicados. El grado de significancia se obtuvo comparando las células tratadas con edelfosina respecto a las células control, los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ (Students t-test).

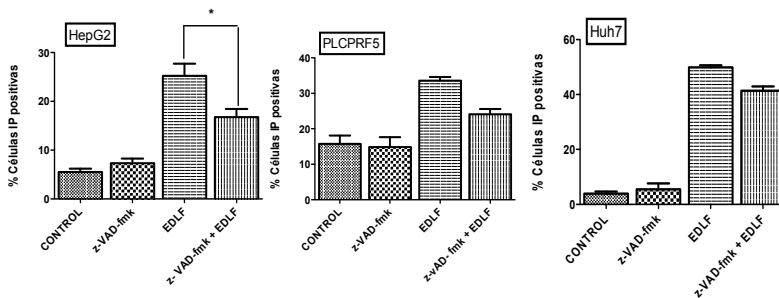


Figura R5. Estudio de la incorporación de IP, tras el tratamiento con el inhibidor z-VAD-fmk. Las células fueron tratadas con el inhibidor de caspasas z-VAD-fmk durante 1 hora, a una concentración de 50 μ M y posteriormente con edelfosina a las concentraciones utilizadas para estudiar la apoptosis (20 μ M, HepG2; 30 μ M PLC/PRF/5 y 30 μ M Huh7), a las 24 horas a continuación las células fueron marcadas con una solución de IP (1mg/mL) durante 5 minutos, y analizadas por citometría de flujo. El grado de significancia estadística se obtuvo comparando las células tratadas solo con EDLF con respecto a las que previamente fueron tratadas con inhibidor z-VAD-fmk, los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. * $p > 0,05$ (Student's t-test).

4.3.1 Autofagia

Uno de los marcadores de autofagia, y de la formación del autofagosoma es el LC3, que es una proteína que se encarga de regular la interacción de los microtúbulos con otros componentes del citoesqueleto. La conjugación de la forma citosólica del LC3 con fosfatidiletanolamina, forma el complejo LC3-PE o LC3-II, que esta reclutado en la membrana del autofagosoma, y al formarse el autolisosoma, el LC3-II que se encuentra en la cara interna del autolisosoma, es degradado.

Se estudió la expresión de la proteína LC3-I y LC3-II, por medio de western blot, y se observó que para el caso de la línea HepG2, no hubo una activación de la proteína, no obstante, a tiempos prolongados de tratamiento, posteriores a las 48 horas, pudo observarse una ligera activación de LC3 en su forma II (Figura R6A). Para la línea PLC/PRF/5, resultó evidente que desde tiempos casi iniciales del tratamiento, la acumulación de LC3-II fue clara, siendo notable una disminución en tiempos de tratamiento superiores a 48 horas (Figura R6A). En el caso de la línea Huh7, se observó que a partir de las 6 horas se generó una acumulación de la forma conjugada de LC3, y gradualmente fue disminuyendo a partir de las 24 horas de tratamiento con edelfosina (Figura R6A)

Para determinar el papel que desempeñaba la autofagia en el proceso de muerte celular en las líneas de cáncer de hígado, se decidió inhibirla con los inhibidores cloroquina y bafilomicina, que actúan evitando la formación del autolisosoma. Se analizó si la inhibición de la autofagia podía favorecer algún tipo de muerte en las líneas celulares de cáncer de hígado. Se observó que en la línea PLC/PRF/5 hubo un aumento significativo en la muerte por apoptosis en células tratadas con cloroquina, comparada con aquella inducida solamente por acción de la edelfosina (Figura R6B). De igual manera, con la inhibición de la autofagia por bafilomicina, se observó un aumento aunque no significativo en la muerte por apoptosis. En las células Huh7 se observó lo contrario a la línea PLC/PRF/5, puesto que la cloroquina no resultó favorecer el aumento de muerte por apoptosis, sino que por el contrario la inhibió más aún en comparación con la muerte producida por EDLF sola (Figura R6b). Sin embargo con la bafilomicina si que se observó un aumento significativo en la muerte por apoptosis (Figura R6B).

Se analizó mediante western blot, el nivel de expresión de las proteínas implicadas en procesos autofágicos, beclin-1, LC3-I y II, así como proteínas características de la activación de la ruta de apoptosis, con el objetivo de valorar la acción de los inhibidores de autofagia.

Se observó una marcada acumulación de LC3 I y II en las dos líneas celulares PLC/PRF/5 y Huh7, al ser tratadas con cloroquina y EDLF (Figura R6C), ya que

este inhibidor actúa evitando la unión de los lisosomas con el autofagosoma, de ahí que LC3 no sea degradado. En el caso de beclin-1, para la línea PLC/PRF/5 se observó una disminución en su expresión en aquellas células tratadas con cloroquina y su combinación con EDLF, mientras que en la línea Huh7 se mostró una expresión basal igual en todas las condiciones del experimento (Figura R6C). Por otra parte se analizó si con la inhibición de la autofagia, podían activarse proteínas típicas involucradas en la ruta apoptótica clásica. Se observó que para el caso de PARP hubo un incremento en la forma clivada (85 kDa) para el caso de las dos líneas celulares, y en el caso de la caspasa 3, solamente se aprecia un incremento en su activación en la línea Huh7. Estos resultados sugieren que la autofagia actúa como un mecanismo de defensa ante la apoptosis y de esta manera, al ser inhibida, la muerte por apoptosis aumenta (Figura R6C).

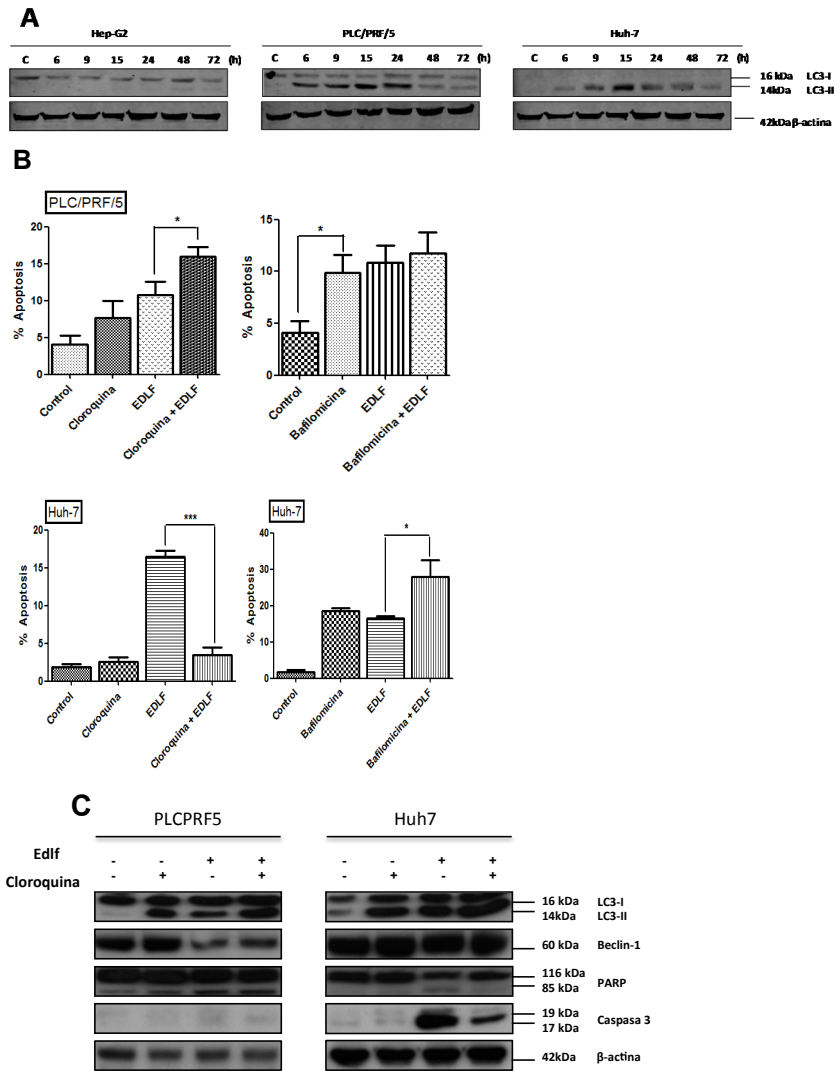


Figura R6. Estudio de la Inhibición de la Autofagia en líneas de cáncer de hígado.

A. Se realizó un time course para monitorizar los niveles de expresión de LC3 I/II. Las células fueron tratadas con edelfosina durante 24 horas a una concentración de 30 μ M y posteriormente se realizó un western blot con los extractos protéicos totales.

B. Se analizó mediante citometría de flujo, el efecto de la inhibición de la autofagia en la muerte celular con los inhibidores cloroquina y bafilomicina, las células fueron pretratadas durante una hora con cloroquina y bafilomicina, y luego durante 24 horas con edelfosina 30 μ M, las células fueron fijadas y analizadas por citometría.

C. El efecto de la inhibición de la autofagia se analizó por WB, se analizó la expresión de proteínas involucradas tanto en las rutas de autofagia como en la apoptosis celular.

Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm E.S.

* $p > 0,05$ (Student's t-test)

4.4 Implicación del calcio en la muerte por apoptosis en el tratamiento con EDLF

Para la determinación del calcio intracelular libres, se utilizó el fluorocromo Fluo-4, el cual actúa uniéndose al calcio libre que se encuentra en el citosol de la célula. Las células se incubaron con edelfosina durante el tiempo y la concentración indicados, fueron observadas al microscopio de fluorescencia y posteriormente fueron medidos los niveles de calcio mediante citometría de flujo. Se detectó que para el caso de la línea celular PLC/PRF/5, el nivel de fluorescencia emitida por la sonda Fluo-4 fue del 20% a las 3 horas de tratamiento con EDLF y llegando hasta más del 50% a las 12 horas de tratamiento. Para las líneas celulares HepG2 y Huh-7, el porcentaje fue de menos del 2% a las 3 horas de tratamiento, sin embargo en la línea HepG2, a las 24 horas de tratamiento, se cuantificó una fluorescencia superior al 40%, comparado con las células sin tratar con edelfosina. Estos resultados indican que existe un aumento en la concentración de calcio citosólico tras el tratamiento con edelfosina en las líneas PLC/PRF/5 y HepG2 (Figura R7A).

Para analizar si el calcio liberado al citosol podía desempeñar algún papel en la muerte celular en las líneas celulares PLC/PRF/5 y HepG2, inducida por edelfosina, se utilizó el compuesto BAPTA-AM agente quelante específico del calcio, para determinar su efecto en la inducción de apoptosis por edelfosina, medida por citometría de flujo.

Los resultados mostraron que en la línea HepG2 hubo una disminución estadísticamente significativa de un 16% a un 5%, en el porcentaje de células apoptóticas (Figura R7B).

En el caso de la línea celular PLC/PRF/5, aunque también hubo una disminución en la población de células apoptóticas, ésta no resultó ser significativa, siendo probable que el calcio no represente un factor importante en éstas células para determinar su vía de muerte (Figura R7B).

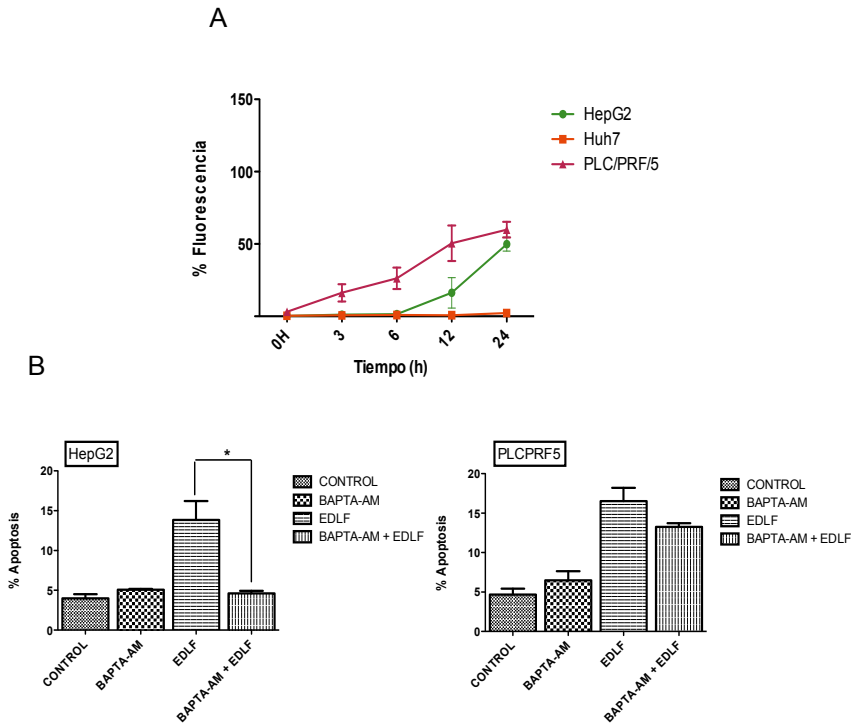


Figura R7. Estudio de la implicación del calcio citosólico en la inducción de apoptosis por edelfosina en líneas celulares de cáncer de hígado.

A. Las células fueron tratadas con edelfosina a los tiempos indicados y a las concentraciones utilizadas para inducir apoptosis; posteriormente se añadió el compuesto Fluo-4 durante 15 minutos, y la fluorescencia emitida fue medida por citometría de flujo. **B.** Se analizó el papel del calcio y su participación en la muerte celular, con el compuesto BAPTA-AM. Las células fueron pretratadas con BAPTA-AM durante una hora y posteriormente se añadió edelfosina (20 μ M para la línea HepG2 y de 30 μ M para la línea PLC/PRF/5) durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las células fueron fijadas con etanol al 70% y se analizó el ciclo celular mediante citometría de flujo para determinar la población apoptótica. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. * $p < 0,05$ (Student's *t*-test)

4.5 Efecto de la edelfosina sobre el estrés de retículo endoplásmico en células de cáncer de hígado

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se ha determinado que el retículo endoplásmico juega un papel importante en la muerte celular en distintos tipos de cáncer [162, 176], por ello se decidió analizar si en las líneas de cáncer de hígado, el retículo endoplásmico participaba en los procesos de muerte generados por el compuesto edelfosina.

Se observó que las proteínas implicadas en el estrés de retículo, tales como la Caspasa 4, se activó desde el primer intervalo de tiempo medido a las 6 horas, y alcanzó su punto máximo de activación a las 9 horas de tratamiento con edelfosina, la proteína Bap-31 de manera muy poco apreciable manifestó su activación puesto que su forma clivada de 20 kDa se apreció levemente en tiempos posteriores a las 24 horas, En el caso de las proteínas GADD-153 y GRP-78, aproximadamente a las 15 horas de tratamiento fue posible observar su expresión, y el p-eif2 α que desde las 6 horas de iniciado el tratamiento con edelfosina se detectó la banda de activación de 40 kDa de esta proteína (Figura R8).

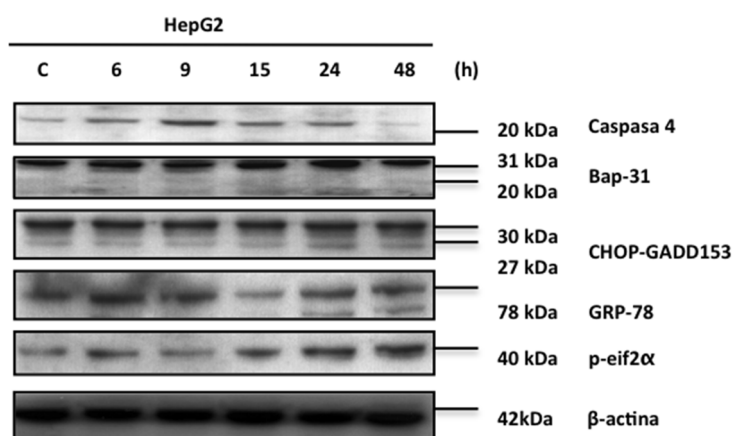


Figura R8. Estudio del efecto de la edelfosina sobre marcadores de estrés del retículo endoplásmico en líneas de cáncer de hígado.

Las células HepG2 fueron tratadas con edelfosina a los tiempos indicados a la concentración utilizada para inducir apoptosis (20 μ M). Transcurrido el tiempo de tratamiento, las muestras fueron procesadas para obtener los extractos proteicos totales. Se analizó la expresión de varias proteínas que participan en procesos de estrés de retículo mediante Western Blot, utilizando anticuerpos específicos.

4.6 Participación de la mitocondria en la muerte celular inducida por edelfosina

En estudios realizados en nuestro grupo, se ha visto que la mitocondria juega un papel importante en la apoptosis inducida por edelfosina en distintos tipos de células tumorales, por lo que se evaluó para el caso del cáncer de hígado la implicación de éste orgánulo en la muerte celular. Para ello se analizó la activación de la caspasa 9 como iniciador de muerte en la línea HepG2, y mediante western blot se analizó su expresión a distintos tiempos de

tratamiento con edelfosina a una concentración de 20 μ M. Se observó en los resultados que la caspasa iniciadora caspasa 9 presentó una fuerte activación a las 15 horas de tratamiento con edelfosina, ya que a este tiempo el fragmento de 17 kDa se encontró presente (Figura R9A). Posteriormente se inhibió la caspasa 9 con el inhibidor específico e irreversible z-LEHD-fmk, para saber la implicación que esta proteína podría tener en la muerte celular. Se observó una fuerte disminución en la población Sub G0-G1 o apoptótica, la cuál fue cuantificada por citometría de flujo tras 1 hora de tratamiento con el inhibidor específico de caspasa 9 a una concentración de 50 μ M , y 24 horas de tratamiento con edelfosina, a una concentración de 30 μ M. Se obtuvo una disminución del 18% al 3% en la población de células en apoptosis (Figura R9B).

4.6.1 Liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol

Otra vía de inducción de apoptosis es la vía llamada mitocondrial. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias lo que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembranal; entre ellas, el citocromo c.

El citocromo c, una vez liberado al citosol, favorece la formación de un complejo proteico llamado apoptosoma, el cuál activa directamente a la caspasa-9. Ésta activa a las caspasas efectoras como la caspasa-3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis.

Se realizó una extracción de proteínas tanto totales como solo de aquellas pertenecientes a la fracción mitocondrial de la células tratadas con edelfosina y observamos que a partir de las 24 horas de tratamiento, la cantidad de citocromo c liberado al citosol va en aumento, mientras que en la fase mitocondrial, tras las 24 horas de tratamiento se observa una clara disminución en la cantidad de proteína que permaneció dentro de la mitocondria (Figura R10).

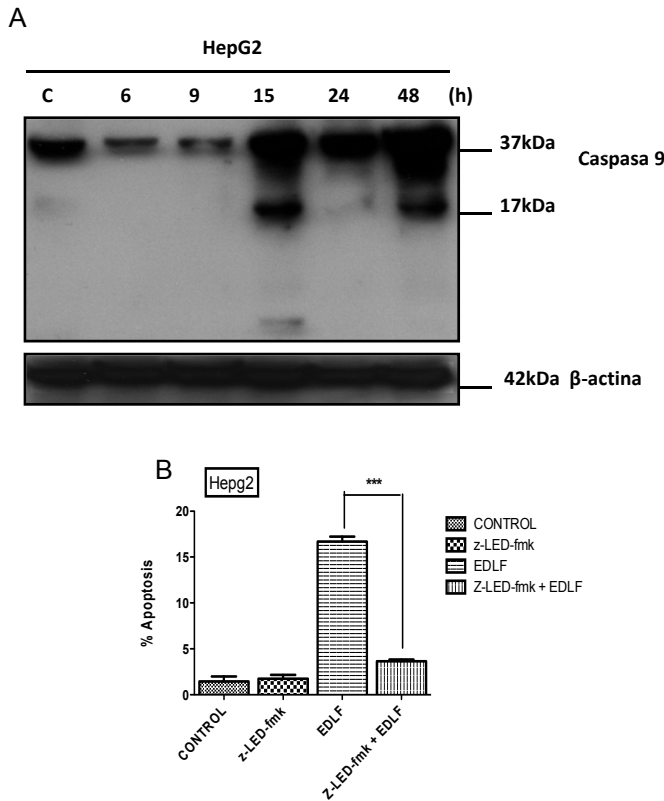


Figura R9. Estudio de la implicación de la caspasa 9 en la muerte celular producida por EDLF en líneas de cáncer de hígado.

A. Time-course de la activación de la caspasa 9 en la línea celular HepG2. Se observa que a las 15 horas de tratamiento se encuentra activada, ya que está presente el fragmento de 17 kDa, continuando hasta las 48 horas de tratamiento con EDLF.

B. Análisis de la muerte celular en la línea HepG2. Las células tras de ser tratadas con el inhibidor específico de caspasa 9 durante 1 hora a una concentración de 50 μ M, y tras 24 horas de tratamiento con edelfosina a una concentración de 20 μ M, fueron levantadas y fijadas en etanol al 70%, durante 24 horas, y posteriormente marcadas con yoduro de propidio para ser cuantificadas en el citómetro. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. *** $p < 0.001$ (Students *t*-test).

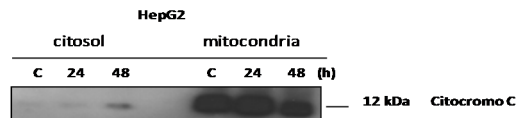


Fig R10. Análisis de la liberación de citocromo c de la mitocondria al citósol.

Se realizó la extracción de proteínas de la fracción mitocondrial, así como de las proteínas citosólicas de las células HepG2 tratadas con edelfosina a los tiempos indicados. Se observó que en la fracción citosólica hay un aumento gradual de citocromo c, debido a la liberación de la mitocondria hacia el citósol. Por otro lado en la fracción mitocondrial se observó que paulatinamente existe una disminución de citocromo c intramitocondrial.

4.6.2 Estudio del papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y cambios en el potencial de Membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Ya habíamos mencionado que la muerte celular programada involucra una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que tienen como principal regulador la mitocondria. Para evaluar el papel de la mitocondria en el tratamiento con edelfosina, realizamos un experimento de time-course para medir los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células de cáncer de hígado. Las líneas celulares fueron tratadas con edelfosina a las concentraciones utilizadas para inducir apoptosis (HepG2, 20 μ M; PLC/PRF/5, 30 μ M, y Huh-7 30 μ M respectivamente) y evaluados a las 15 y 24 horas. Para ello se realizó una doble tinción para determinar el $\Delta\Psi_m$, mediante el empleo de DiOC6 (fluorescencia verde), un compuesto catiónico que se acumula en la mitocondria en función de su potencial, y para analizar la producción de ROS con DHE (un compuesto no fluorescente) que se convierte en etidio (Eth; fluorescencia roja) después de su oxidación. En la figura R11 se observa el análisis de ambos parámetros y el comportamiento de las células tratadas con edelfosina. Las células de las tres líneas celulares de cáncer de hígado que no fueron tratadas (control), mostraron un alto $\Delta\Psi_m$ ($\text{DiOC}_6(3)^{\text{High}}$) y un bajo nivel de ROS ($(\text{HE} \rightarrow \text{Eth})^{\text{Low}}$), valores que fueron tomados como referencia. Tras 15 horas de tratamiento, se observaron las células de las líneas HepG2 y PLC/PRF/5 con una notable pérdida del $\Delta\Psi_m$ (incremento en $\text{DiOC}_6(3)^{\text{Low}}$) del 13% y 28% respectivamente, y ligeras variaciones de ROS ($(\text{HE} \rightarrow \text{Eth})^{\text{High}}$), ambos parámetros permanecieron casi sin variación hasta las 24 horas.

En el caso de la línea Huh-7 por el contrario se observaron variaciones casi inapreciables en el $\Delta\Psi_m$ ($\text{DiOC}_6(3)^{\text{High}}$) y aumentos elevados en los niveles de ROS ($(\text{HE} \rightarrow \text{Eth})^{\text{High}}$) hasta del 32%.

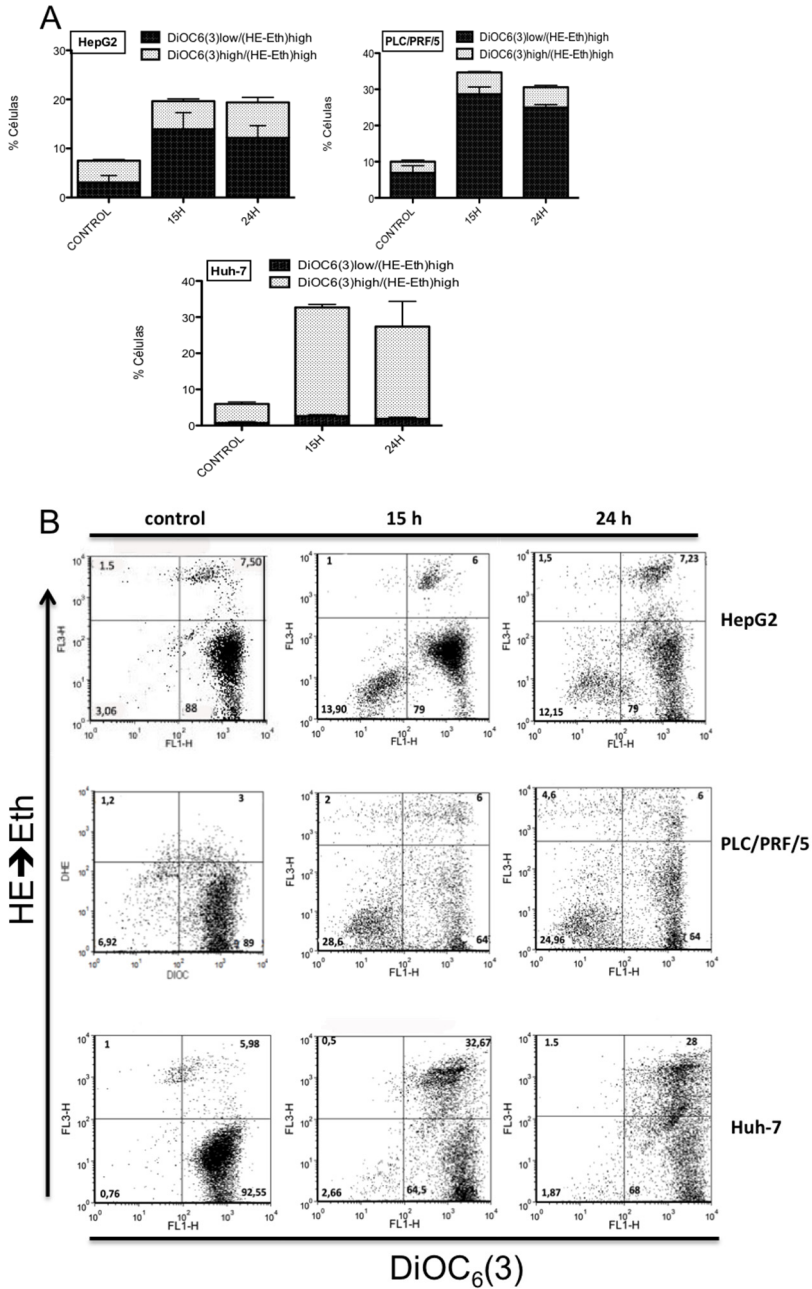


Figura R11. Efecto de la edelfosina sobre $\Delta\Psi_m$ y producción de ROS en células de cáncer de hígado. **A.** Líneas celulares de cáncer de hígado tratadas con edelfosina durante 15 y 24 h se analizaron para evaluar la pérdida del $\Delta\Psi_m$ (DiOC₆(3)) y la producción de ROS (HE→Eth) por citometría de flujo, los resultados son el valor medio de 2 experimentos realizados. **B.** Experimento representativo de tres realizados sobre el efecto de la edelfosina sobre el $\Delta\Psi_m$ y la generación de ROS en líneas de cáncer de hígado.

4.6.3 Efecto del antioxidante N-acetil-cisteína (NAC) sobre la muerte inducida por EDLF

Debido a las observaciones del apartado anterior en el aumento de ROS y la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, se decidió evaluar el efecto de la N-acetil-cisteína sobre la muerte celular inducida por edelfosina en células de cáncer de hígado, la cual fue medida por el porcentaje de células hipodiploides o en fase Sub G₀-G₁. Aquí encontramos que las células tumorales pre-tratadas con NAC fueron protegidas de la muerte inducida por edelfosina de manera significativa (Figura R12). Estos resultados indican que el estrés oxidativo es un factor importante, aunque quizás no sea el único, determinante en la acción citotóxica de la edelfosina.

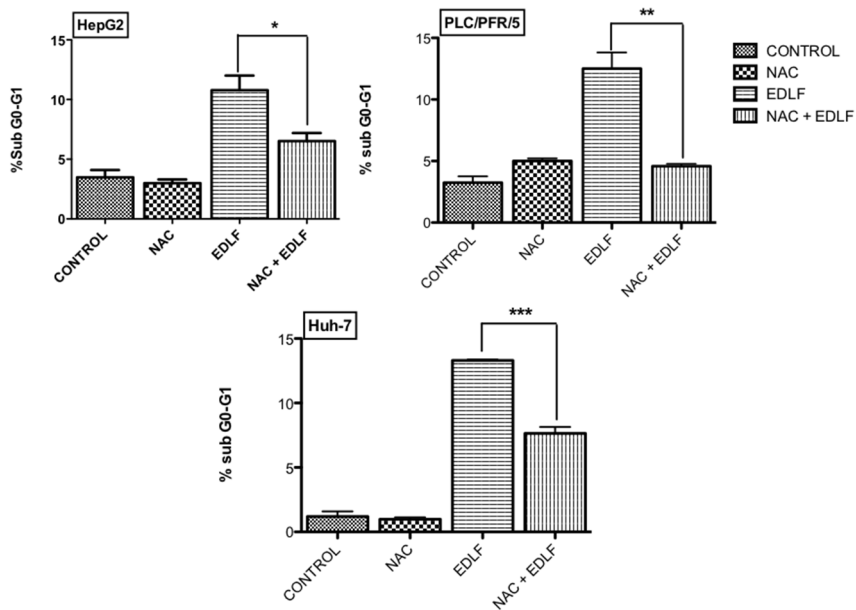


Figura R12. Efecto de la inhibición de la producción de ROS en la apoptosis inducida por edelfosina en células de cáncer de hígado.

Las líneas celulares de cáncer de hígado se preincubaron con el antioxidante N-Acetil cisteína, a una concentración de 10mM durante 2 horas, y fueron tratadas en presencia o ausencia de edelfosina a las concentraciones utilizadas para inducir apoptosis (HepG2, 20 μ M; PLC/PRF/5, 30 μ M; y Huh-7, 30 μ M) durante 24 horas, y de manera paralela se analizaron células control que no habían sido tratadas con NAC ni edelfosina, el porcentaje de células hipodiploides o en fase Sub G₀-G₁ fue medido por citometría de flujo. Los datos mostrados son correspondientes a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. *** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

4.7 Efecto de la edelfosina sobre la vía de señalización de las MAPK en el tratamiento de células de cáncer de hígado

4.7.1 Activación de JNK

Las MAPKs son proteínas que se activan en respuesta a estímulos de estrés, participan en procesos apoptóticos e inflamatorios, modifican la actividad de numerosas proteínas que están localizadas en la mitocondria y en el núcleo celular. Las JNKs son proteínas kinasas que se activan respondiendo a señales de estrés, las cuáles modifican la actividad de numerosas proteínas que residen en la mitocondria o en el núcleo mediante fosforilación, con lo que regula diversas e importantes funciones celulares. Entre los diferentes estímulos que pueden activar a las JNKs destacan las señales inflamatorias, variaciones en los niveles de las especies reactivas del oxígeno, radiación ultravioleta, inhibidores de la síntesis de proteínas.

Debido al aumento en los niveles de ROS y al estrés de retículo observado en las células tratadas con EDLF, se consideró importante el analizar el papel que ejerce la JNK en la muerte celular, por ello, mediante western blot se analizó el patrón de expresión y activación de la JNK durante el tratamiento con edelfosina a distintos tiempos. Se observó que en las tres líneas hubo un aumento considerable en la fosforilación de la proteína JNK en la línea HepG2 y PLC/PRF/5 desde tiempos iniciales del tratamiento, manteniéndose la fosforilación hasta tiempos muy prolongados, mientras que en la línea Huh-7 esta activación fue apreciable entre las 9 y 15 horas de tratamiento con edelfosina, y a partir de las 24 horas la fosforilación de la proteína disminuyó de manera importante (Figura R13A).

Para comprobar si la activación de la JNK tenía una participación en la regulación de la apoptosis, se inhibió la proteína con el inhibidor específico de JNK SP600125. Se encontró una disminución significativa en el porcentaje de población la apoptótica en las tres líneas celulares empleadas. Para el caso de la línea HepG2, se observó una disminución del 15% al 10% en el número de células en fase Sub G₀-G₁ o apoptótica, en la línea PLC/PRF/5, la combinación con el inhibidor disminuyó la muerte en un bajo porcentaje de un 12 a un 8%.

Finalmente en las células de la línea Huh-7, se encontró que también la combinación del inhibidor específico de JNK y la edelfosina fue efectiva en la disminución de la apoptosis al compararla con la muerte celular inducida por edelfosina, observando que el porcentaje disminuyó del 15% al 11%, y fue estadísticamente significativo (Figura R13B).

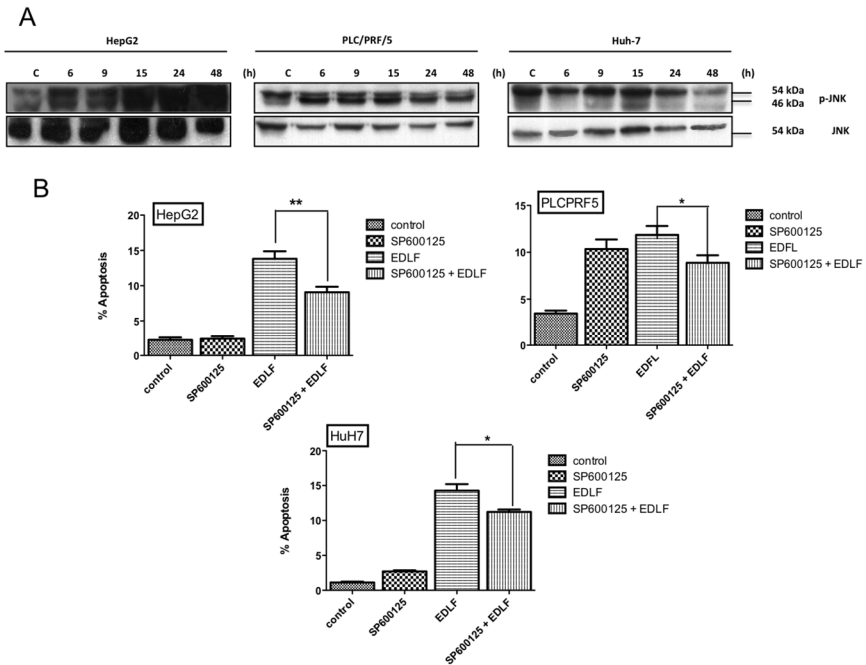


Fig R13. Estudio de la activación de la vía de JNK como respuesta al tratamiento con edelfosina en líneas de cáncer de hígado.

A. Análisis de la activación de JNK en líneas de cáncer de hígado tratadas con edelfosina (HepG2, 20 μ M; PLC/PRF/5, 30 μ M; y Huh-7, 30 μ M.) a los tiempos indicados mediante un estudio por western blot usando anticuerpos específicos correspondientes. **B.** Efecto de la inhibición de JNK con el inhibidor SP600125 sobre la apoptosis inducida en células de cáncer de hígado tratadas con edelfosina. El porcentaje de apoptosis fue cuantificado por citometría de flujo. Para el análisis estadístico, fue comparado el porcentaje de células en apoptosis entre los tratamientos de edelfosina y SP600125 + edelfosina. Los datos mostrados son correspondientes a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

4.7.2 Activación de ERK 1/2

ERK1 and ERK2 son proteínas serina/treonina quinasas que participan en la vía de señalización de Ras-Raf-MEK-ERK. Esta ruta participa en la regulación de una gran variedad de procesos como la progresión del ciclo celular, la adhesión, migración, supervivencia, diferenciación, proliferación, entre otros.

Por ello se estudió la fosforilación de ERK1/2, que ejerce un papel importante en la ruta mediada por MAPKs. En todas las líneas estudiadas se observó una fosforilación basal de ERK1/2 (Figura R14A). En las líneas celulares HepG2 y PLC/PRF/5, la fosforilación de ERK1/2 aumentó desde las 6 horas de tratamiento con edelfosina hasta las 24 horas de tratamiento en el caso de la línea HepG2, mientras que para la línea PLC/PRF/5 este aumento continuó estable hasta las

48 horas de tratamiento. En cambio para la línea celular Huh-7, edelfosina indujo una inhibición de la fosforilación de ERK1/2 (Figura R14A).

Se estudió el efecto de la inhibición de la ruta de las MAPKs mediante el empleo de U0126, inhibidor de MEK, una proteína que se localiza “upstream” de ERK, sobre la apoptosis en las líneas de cáncer de hígado. En las líneas celulares HepG2 y PLC/PRF/5 se observó una disminución en el porcentaje de apoptosis, en aquellas células que fueron tratadas con el inhibidor previo al tratamiento con edelfosina, registrándose una disminución del 15% al 11% en la línea HepG2, y en la línea PLC/PRF/5 del 13% al 6%, siendo este último valor estadísticamente significativo (Figura R14B). En la línea celular Huh-7, por el contrario, se observó que la combinación del inhibidor U0126 y edelfosina resultó ser más letal a las células, que el tratamiento con edelfosina solamente, aumentando de un 16% hasta casi el 25% (Figura R14B).

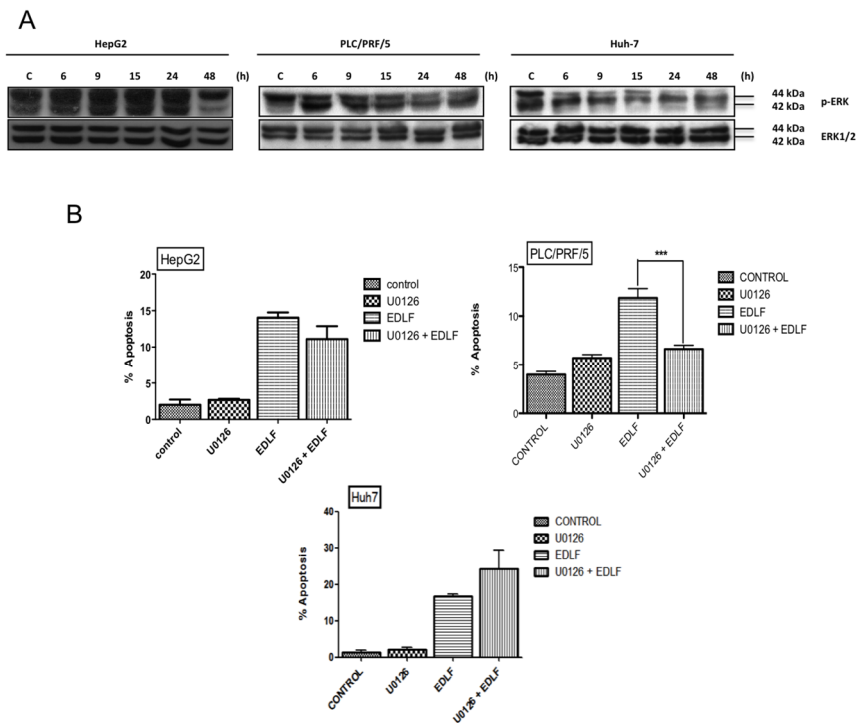


Fig R14 . Análisis de la activación de vías de señalización de ERK1/2 como respuesta al tratamiento con EDLF en líneas de cáncer de hígado.

A. Análisis de la activación de ERK1/2 en líneas de cáncer de hígado tratadas con edelfosina (HepG2, 20 μ M; PLC/PRF/5, 30 μ M; y Huh-7, 30 μ M.) a los tiempos indicados, se realizó un estudio mediante Western Blot con los anticuerpos correspondientes.

B. Efecto de la inhibición de ERK1/2 sobre la apoptosis en células de cáncer de hígado tratadas con edelfosina y con el inhibidor U0126. El porcentaje de apoptosis fue cuantificado por citometría de flujo. Para el análisis estadístico, fue comparado el porcentaje de células en apoptosis entre los tratamiento de edelfosina y U0126 +

edelfosina. Los datos mostrados son correspondientes a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. *** $p < 0.001$ (Student's *t*-test).

4.8 Efecto de la edelfosina sobre la ruta de PI3K/AKT en líneas celulares de cáncer de hígado

Quisimos estudiar si el tratamiento con edelfosina podía tener efectos sobre la señalización de la vía oncogénica PI3K-Akt-mTOR en cáncer de hígado, ya que esta es una de las rutas de supervivencia más importantes que confieren resistencia celular en distintos tipos de cáncer. Para ello se hizo un estudio de la expresión y activación de la proteína Akt en distintos tiempos de tratamiento con edelfosina. Se observó por western blot que en la línea celular HepG2 paulatinamente fue aumentando la fosforilación del residuo Ser473, mientras que la Thr 308 se encontró fosforilada de manera constitutiva en el control y disminuyó su fosforilación al cabo de 6 y 15 horas de tratamiento, coincidiendo con un incremento en la fosforilación del residuo Ser473 (Figura R15). En la línea celular PLC/PRF/5, tanto la forma activada de Akt en los residuos Ser473 y Thr308 que de manera constitutiva estaba activada en el control, fue disminuyendo en su expresión durante el tratamiento hasta las 48 horas (Figura R15). Finalmente en la línea celular Huh7, la fosforilación del residuo Ser473 no se detectó sino hasta las 48 horas de tratamiento, y la fosforilación del residuo Thr308 que se encontró de manera constitutiva en el control, disminuyó gradualmente durante el tratamiento, no pudiendo ser detectada a partir de las 24 horas de tratamiento (Figura R15A).

Se analizó también el efecto de la inhibición de Akt con los inhibidores específicos Akt III, VIII y X, sobre la apoptosis de las líneas celulares de cáncer de hígado. Se observó en la línea celular HepG2 que al ser tratada con el inhibidor Akt X únicamente, la apoptosis aumentó hasta un 35%, y al combinar el tratamiento con edelfosina la muerte se potenció hasta un 40% (Figura R15B). Los inhibidores III y VIII por el contrario, inhibieron el porcentaje de células en apoptosis respecto a aquellas que solamente fueron tratadas con edelfosina. En las células PLC/PRF/5, solamente el inhibidor Akt X aumentó de manera significativa el porcentaje apoptosis respecto al control, y en combinación con edelfosina la muerte se elevó hasta cerca del 15% respecto a aquellas células que solo fueron tratadas con edelfosina; tanto el inhibidor Akt III como el Akt VIII disminuyeron la muerte en combinación con edelfosina (Figura R15B). En la línea Huh-7 los inhibidores Akt III y Akt X aumentaron el porcentaje de apoptosis en las células, hasta un 44% y 66% respectivamente, y al igual que en las líneas HepG2 y PLC/PRF/5, el inhibidor Akt VIII disminuyó el porcentaje de muerte en combinación con el tratamiento con edelfosina (Figura R15B).

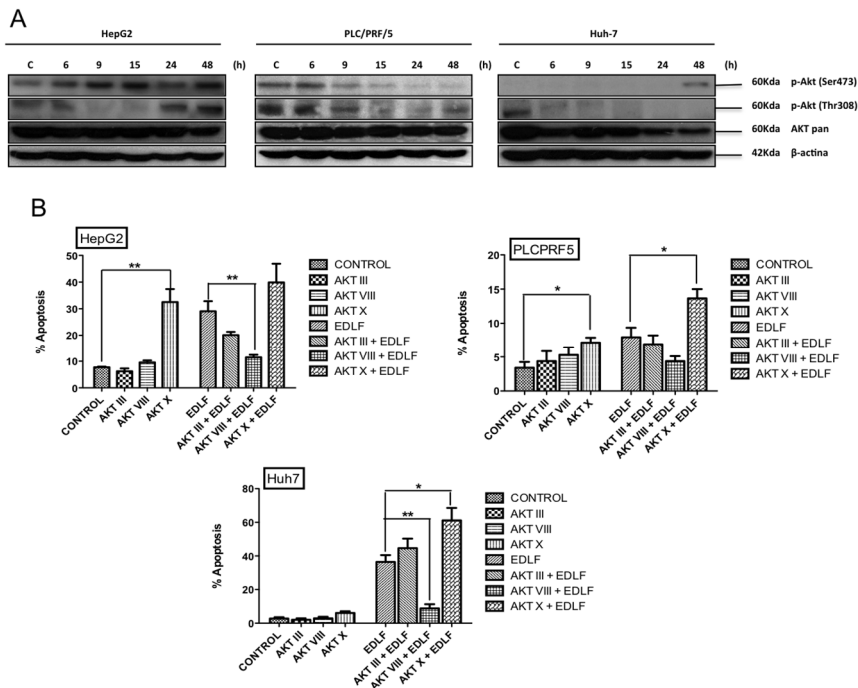


Fig R15. Estudio de las ruta de señalización de Akt en líneas de cáncer de hígado tratadas con edelfosina.

A. Análisis de la activación de Akt en líneas de cáncer de hígado tratadas con edelfosina (HepG2, 20 μ M; PLC/PRF/5, 30 μ M; y Huh-7, 30 μ M.) a los tiempos indicados, se realizó un estudio mediante western blot usando anticuerpos correspondientes.

B. Efecto de la inhibición de Akt sobre la inducción de apoptosis en células de cáncer de hígado tratadas con edelfosina. Se utilizaron los inhibidores Akt III, Akt VIII y Akt X, a una concentración de 10 μ M, 10 μ M y 5 μ M respectivamente, durante 1 hora de incubación previa al tratamiento con EDLF, tras lo cuál las células fueron tratadas en presencia y ausencia de edelfosina a las respectivas concentraciones (HepG2, 20 μ M; PLC/PRF/5, 30 μ M; y Huh-7, 30 μ M.) El porcentaje de apoptosis fue cuantificado por citometría de flujo. Los datos mostrados son correspondientes a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

Sección 2: Hipoxia y muerte celular

4.9 Estudio de la expresión de HIF-1 α como principal marcador de hipoxia en líneas celulares de cáncer hepático

Anteriormente mencionamos que la hipoxia juega un papel crítico en el desarrollo y la progresión del cáncer y los factores inducidos por hipoxia son mediadores importantes de la respuesta mediada por hipoxia [177]. HIF-1 es un complejo heterodimérico, el cual contiene dos factores de transcripción de tipo helix-loop-helix, HIF-1 α and HIF-1 β [178], que son los responsables de activar la transcripción de genes diana bajo condiciones de hipoxia [179]. En el cáncer, la hipoxia intratumoral asociada con la expresión de HIF-1 α , está considerada como un importante mecanismo responsable de la progresión tumoral, metástasis y mortalidad en el paciente [180]. Basándonos en este razonamiento decidimos analizar una de las líneas de cáncer hepático, y estudiar la expresión de HIF-1 α mediante un estudio de time-course. Además se utilizó la línea HeLa para estudiarla en paralelo con la línea celular de cáncer de hígado. Se observó en el estudio de time-course que la expresión de la proteína HIF-1 α , aumenta de manera gradual con el tiempo de exposición de las células al ambiente de hipoxia (inducida por la bajada de O₂ dentro del incubador); a las 4 horas de exposición para el caso de la línea celular HeLa, y a las 2 horas para las células HepG2 se observó una notoria expresión de HIF-1 α (Figura R16).

Comparando con compuestos inductores de hipoxia fue posible mimetizar la hipoxia intracelular utilizando DFO (deferrioxamina) a 300 μ M de concentración, que actúa como un agente quelante de hierro y captador de radicales libres en la células, en este caso del oxígeno (Figura R16). Con la utilización de la DFO mantuvimos la expresión de HIF-1 α de manera más estable, y mas prolongada en el tiempo, además de que también la aparición de HIF-1 α como marcador de hipoxia se detectó a tiempos más iniciales del tratamiento, 1 hora tras ser añadida en ambas líneas.

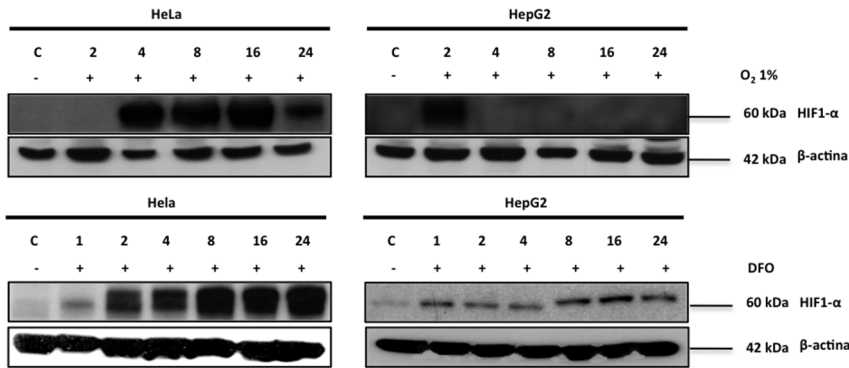


Fig R16. Estudio de la Expresión de HIF-1α como marcador de hipoxia en líneas celulares.

Análisis de la expresión de HIF-1α en las líneas celulares HeLa y HepG2, utilizando hipoxia inducida por una bajada de O₂ y por el compuesto DFO (deferroxamina) usado a 300 μM. Las células fueron expuestas a un ambiente de hipoxia o tratadas con DFO para inducir hipoxia. Las proteínas totales fueron extraídas a distintos tiempos y analizadas mediante western blot con el anticuerpo correspondiente.

4.10 La hipoxia no altera el efecto apoptótico de la Edelfosina

La apoptosis puede ser inducida en respuesta a la hipoxia, y el grado de hipoxia en el tejido puede determinar si las células toman la apoptosis como destino o bien se adaptan a ella y sobreviven.

Para estudiar qué tipo de efecto podría tener la edelfosina en células tumorales expuestas a una hipoxia constante, realizamos experimentos tratando en paralelo las líneas tumorales HeLa y HepG2 con edelfosina a las concentraciones utilizadas para inducir apoptosis, 20 μM para el caso de la línea celular HepG2 y 10 μM en la línea celular HeLa.

Encontramos comportamientos contradictorios en las dos líneas celulares puesto que, en la línea celular HeLa se registró un incremento en la muerte celular inducida por edelfosina en condiciones de hipoxia ambiental respecto a aquella que se registró en condiciones normales de oxígeno, del mismo modo hubo un aumento de la población apoptótica en condiciones de hipoxia inducida con DFO (Figura R17).

En la línea HepG2, se observó que la muerte inducida por edelfosina en condiciones de hipoxia ambiental fue menor, comparándola con respecto a los datos obtenidos en la muerte celular en condiciones de normoxia. Sin embargo, al analizar los datos de la muerte producida por la hipoxia inducida químicamente con DFO, el porcentaje de muerte ya por defecto inducido por la DFO era elevado.

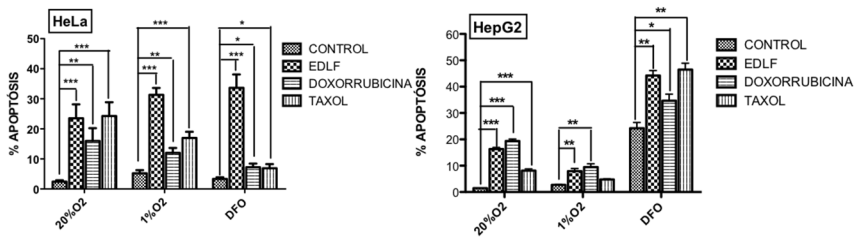


Figura R17. Efecto de la edelfosina y otros antitumorales en células de cáncer de hígado expuestas a distintas condiciones ambientales de oxígeno. Las líneas celulares HeLa y HepG2 fueron tratadas con los distintos compuestos antitumorales (edelfosina, 10 μ M; doxorubicina, 1 μ M y taxol 50 μ M para la línea HeLa) (edelfosina, 20 μ M; doxorubicina, 1 μ M y taxol 50 μ M para la línea HepG2). Las condiciones de O₂ en el ambiente fueron 20% normoxia, 1% hipoxia, e hipoxia inducida por DFO a 300 μ M de concentración.

Sección 3: Células Stem

4.11 Formación de hepatoesferas o cultivos 3D

En los últimos años, los crecientes avances en las técnicas de cultivo han llevado al desarrollo de modelos más eficaces en el estudio de diversas investigaciones, y la necesidad de mejorar los estudios relativos al microambiente tumoral entre otros ha contribuido al desarrollo y estudio de modelos de condiciones de cultivo en tres dimensiones (3D). La identificación y caracterización de células stem hepáticas (HSC del inglés hepatic stem cells) es un punto importante en el estudio de la regeneración del tejido hepático. Estas células son responsables de la recidiva tumoral, metástasis, y la quimiorresistencia. Las CSC de hígado dictan una organización jerárquica que es compartida tanto en la organogénesis y la tumorigénesis. Una mayor comprensión de los eventos moleculares involucrados en la señalización que regulan la jerarquía y la troncalidad celular, y el éxito en la definición de los genes clave específicos de las CSC, han abierto nuevas vías para acelerar el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento [65].

En estudios previos realizados por otros laboratorios, se encontró que distintas líneas de cáncer del mismo tipo de tejido contienen porcentajes distintos de side population (SP), que es una población de células con características determinadas, que son distintas al conjunto completo de la población celular, en este caso características stem. En este trabajo se utilizó la línea PLC/PRF/5 como línea parental para la formación de hepatoesferas, la cual posee un porcentaje del 0.8% de SP [181]. Se utilizaron distintos marcadores celulares de superficie para identificar la población de células con las características específicas de células stem hepáticas, como CD133+, CD90+, CD34+, CD44+ y EpCam+, inicialmente se hizo solo un screening de los porcentajes de cada marcador en la línea tumoral (figura R20) y posteriormente a la formación de las esferas, se llevó a cabo un sorting de la SP con los marcadores que ya mencionamos anteriormente.

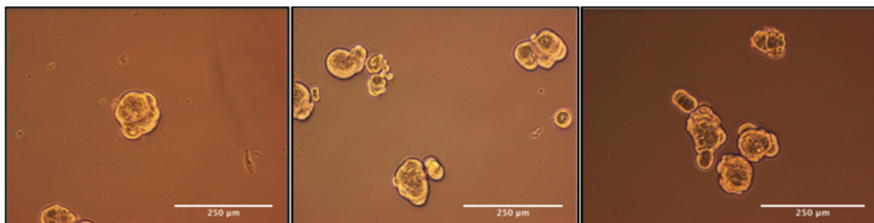


Figura R18. Morfología de las esferas formadas a partir de la línea parental PLC/PRF/5.

La línea celular PLC/PRF/5, fue cultivada en una superficie de ultra baja adherencia en medio sin suero y con factores de crecimiento y las esferas comenzaron a formarse luego de 4-7 días de cultivo. Barra de escala 250 μm

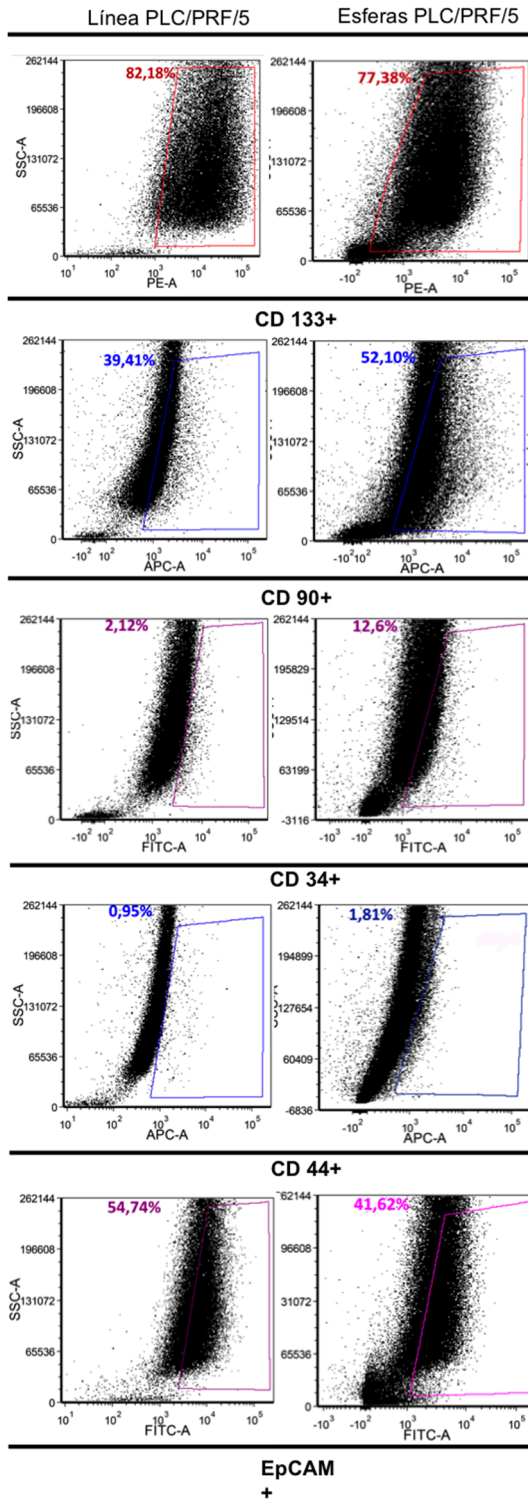


Fig R19. Análisis comparativo de marcadores de superficie la línea PLC/PRF/5 y de las esferas formadas a partir de la misma línea.

Las línea celular y las esferas se cultivaron por separado y en paralelo.

Fueron marcadas con los anticuerpos de superficie correspondientes. Todas las muestras fueron analizadas por citometría de flujo y los datos analizados con el software FCS express 5 Plus Research Edición.

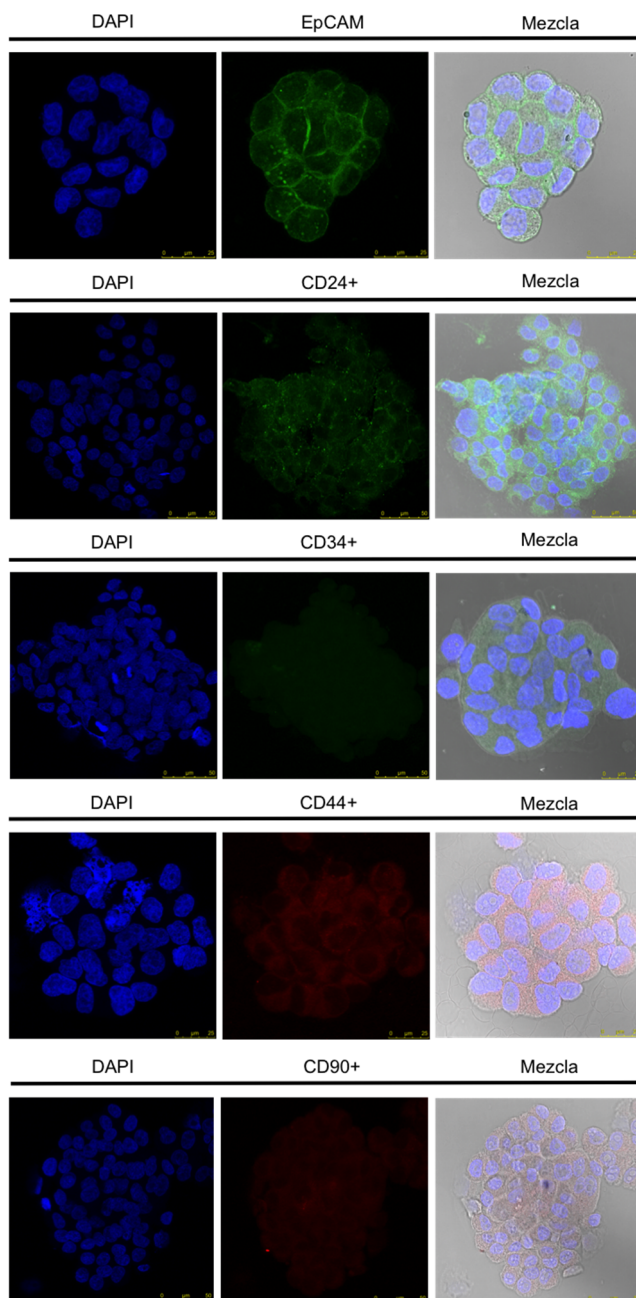


Figura R20. Análisis inmunocitoquímico de Hepatoesferas de la línea celular PLC/PRF/5. Se realizó una tinción inmunocitoquímica para analizar el potencial multilíneaje de las hepatoesferas. Fueron cultivadas durante 7 días y luego teñidas con los marcadores correspondientes, de acuerdo al protocolo, y observadas al microscopio confocal. Barra de escala, 50 µm.

4.12 La edelfosina inhibe la formación de esferas en agar (Ensayo de clonogenicidad)

Las hepatoesferas formadas a partir de la línea celular PLC/PFR/5, fueron disgregadas y cultivadas por duplicado en una matriz de agar que contenía edelfosina a diferentes concentraciones (1, 10 y 100 nM y 1 y 10 μ M). Tras 10 días de crecimiento, comenzó a observarse la aparición de colonias pequeñas. El cultivo se prolongó hasta los 21 días y se realizó el conteo final de colonias en cada pocillo que fueran iguales o mayores a 100 micras de tamaño. Se observó con en el transcurso de los días que en aquellos pocillos con concentraciones de edelfosina mayores, la cantidad de colonias formadas era mucho menor que en aquellos con concentraciones más bajas del éter-lípido (Figura R21).

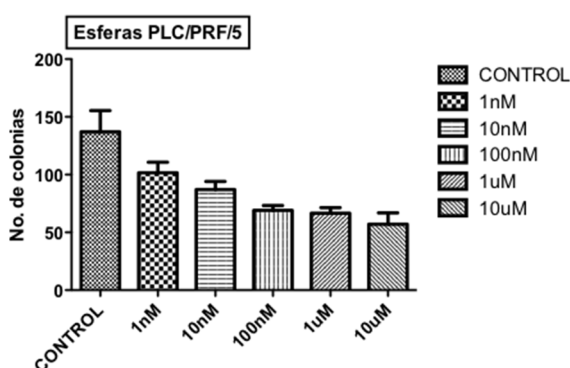


Figura R21. Efecto de la edelfosina sobre la formación de esferas en agar.

Las esferas disgregadas fueron cultivadas en una matriz de agar con y sin edelfosina a distintas concentraciones. Tras de 21 días de incubación se realizó un conteo bajo el microscopio de aquellas esferas con un tamaño mayor o igual a 100 micras

4.13 La edelfosina induce muerte por apoptosis en hepatoesferas de la línea celular PLC/PRF/5

En las células normales, la distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática es asimétrica, la membrana interna contiene fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina (PS) y la membrana externa fundamentalmente fosfolípidos neutros. En una célula apoptótica se produce una translocación de los residuos de PS de la membrana interna a la membrana externa, quedando de esta manera los residuos de PS expuestos al exterior. Esto ocurre en la fase inicial de la apoptosis temprana, donde la integridad de la membrana plasmática se mantiene. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} que tiene afinidad por los residuos de PS. Así la anexina V puede unirse a la PS de las células apoptóticas, al tener expuestos los residuos de PS en la membrana externa de la célula, fundamento por el cual se discriminan las

células apoptóticas de aquellas que no lo son, o que sufren otro tipo de muerte celular. Para analizar si la edelfosina podría inducir algún tipo de muerte en las hepatoesferas, se disgregaron según el protocolo descrito en Materiales y métodos, fueron distribuidas en medio fresco para células stem a una densidad de 5,000 células por mL de medio, y una vez formadas las esferas nuevamente tras 7 días fueron tratadas con distintas concentraciones de edelfosina (10, 20 y 30 μ M) durante 72 h.

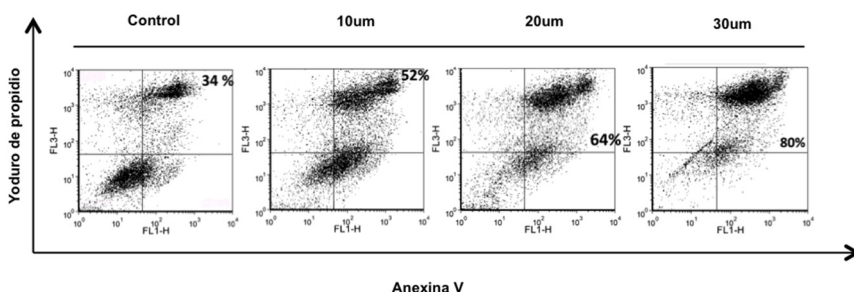


Fig R22. Análisis de la Muerte celular producida por edelfosina en hepatoesferas de la línea PLC/PRF/5.

Las esferas formadas a partir de la línea PLC/PRF/5, fueron tratadas con distintas concentraciones de edelfosina durante 72 horas, luego fueron disgregadas y marcadas con Anexina V y con yoduro de propidio para ser analizadas por citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

4.14 Análisis diferencial de expresión génica entre hepatoesferas vs. línea celular parental PLC/PRF/5

Para la inicial caracterización de la SP aislada a partir de la línea celular PLC/PRF/5, se realizó un análisis de expresión génica diferencial utilizando el Gene Chip Human Gene 1.0 ST Array de Affymetrix.

Se determinaron los genes expresados diferencialmente entre la línea PLC/PRF/5 y las hepatoesferas formadas a partir de la línea, se obtuvo una lista de 7144 genes regulados de manera positiva.

Se eligieron 337 genes por el valor de R. fold, (1,108050897 hasta 33,72428756), así como genes conocidos implicados en distintas funciones biológicas, entre ellos AREG [182], JAK3, involucrados en proliferación; ABCB1, ABCC2 [183, 184], ASPH, TTR, que son genes transportadores; SPIN2B, que regula la apoptosis; VIM, de proteínas estructurales [185] y PECAM1 que participa en señalización celular. Se realizó un análisis del enriquecimiento modular, se eligieron 14 categorías incluyendo aquellos con función desconocida u otras funciones distintas a las de nuestro interés. Se obtuvieron los datos mostrados en la grafica de la figura R24, en donde se observa que un 9% de los genes analizados se

clasifica como transportadores, un 5% de ellos participantes en transducción de señales, el 4% como transportadores de iones, entre los más importantes.[186-188]. Con programación en lenguaje R, se utilizaron los paquetes de Bioconductor para ejecutar los diferentes algoritmos.

La normalización y el cálculo de señal se realizaron mediante el algoritmo RMA (Robust Microarray Analysis) [189-191] y el cálculo de expresión diferencial mediante SAM (Significance Analysis of Microarrays) [192], que incluye una estimación del error con el algoritmo FDR (False Discovery Rate)

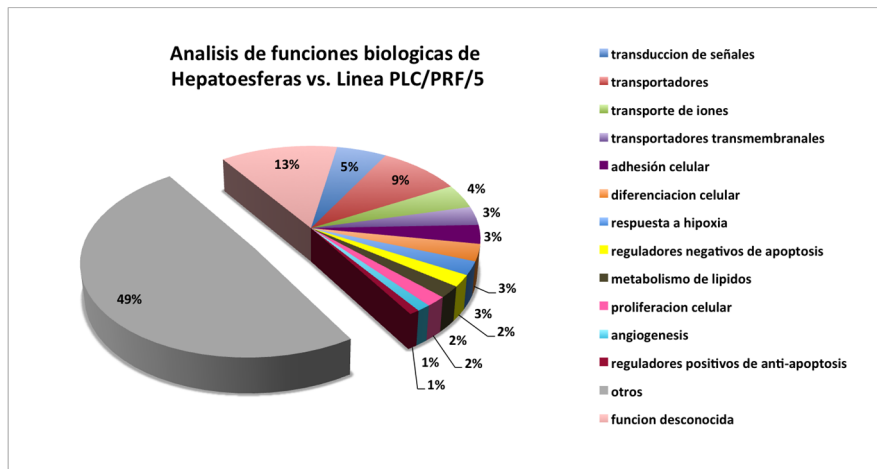


Fig R24. Identificación de genes expresados diferencialmente en la línea celular PLC/PRF/5 vs hepatoesferas (SP).

La función biológica de los genes expresados diferencialmente, fue determinado por el Gene Chip Human Gene 1.0 ST Array, se seleccionaron 337 genes, de los cuales el 12%, 42 genes según las bases de datos tienen una función desconocida. Los 295 genes restantes se sometieron a un análisis de enriquecimiento modular.

La tabla muestra las anotaciones de co-ocurrencia encontradas por GeneCodis3. Los p valores fueron obtenidos a través del análisis hypergeométrico, corregido por el método FDR.

A continuación se ha añadido la tabla de aquellos genes regulados de manera positiva obtenidos en el análisis diferencial de la expresión génica, entre la línea celular PLC/PRF/5 y las hepatoesféras provenientes de la misma línea.

Análisis de Expresión Diferencial: Esferas vs Control 13880 genes-probesets con FDR = 0.05 (≈5% falsos positivos)							
nº	probes et ID	d.value	p.value	q.value	R.fold	Genename	Description
90	7908459	47,41195279	0,000316843	0,021983704	33,72428756	CFH	complement factor H
84	7991766	47,70786792	0,000301158	0,021983704	18,78871271	HBA1	hemoglobin, alpha 1
85	7991762	47,70786792	0,000301158	0,021983704	18,78871271	HBA2	hemoglobin, alpha 2
405	8028963	25,9705926	0,001352072	0,021983704	16,59694135	CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6
173	8015124	37,37724199	0,000592904	0,021983704	15,33812511	KRT20	keratin 20
163	8140686	38,0930066	0,000561533	0,021983704	13,01671877	SEMA3D	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3D
19	7965606	77,99417031	7,52894E-05	0,021983704	11,63426655	HAL	histidine ammonia-lyase
4132	8135033	7,797499182	0,013752863	0,022384091	10,94309148	MUC12	mucin 12, cell surface associated
3568	8135031	8,646529872	0,011820435	0,022271567	9,239896469	MUC12	mucin 12, cell surface associated
551	7981990	23,09760937	0,001841453	0,021983704	7,521172166	SNORD116-21	small nucleolar RNA, C/D box 116-21
399	8104268	26,10136698	0,00133325	0,021983704	7,42006579	SLC6A19	solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 19
198	8060805	35,01273056	0,00067133	0,021983704	6,938155309	CHGB	chromogranin B (secretogranin 1)
996	8081959	18,07972096	0,0032656	0,021983704	6,698146879	STXBP5L	syntaxin binding protein 5-like
6	8095628	202,7349065	2,82335E-05	0,021983704	6,665845544	ALB	albumin
1070	7938128	17,50994688	0,00349782	0,021983704	6,358213918	DNHD1	dynein heavy chain domain 1
172	7913216	37,55897594	0,000589767	0,021983704	6,205421774	PLA2G2A	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)
123	8095585	41,93635088	0,000432914	0,021983704	5,720214635	SLC4A4	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4
542	8040430	23,28483867	0,001803808	0,021983704	5,615179187	VSNL1	visinin-like 1

Resultados

312	8138381	29,16402603	0,001047777	0,021983704	5,601628058	AGR2	anterior gradient 2 homolog (Xenopus laevis)
1493	8071420	14,6169908	0,004896948	0,022056024	5,514471094	SERPIND1	serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1
2532	8088636	10,73469042	0,008341437	0,022123283	5,480139025	LOC100508226	HHSL751
18	8063590	79,7322066	7,21523E-05	0,021983704	5,412582602	PCK1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)
51	7945680	57,46979511	0,000178812	0,021983704	5,221831249	H19	H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)
140	7930498	40,01440325	0,000489381	0,021983704	5,211642719	ACSL5	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5
5712	7902400	6,142223151	0,019308592	0,022732035	5,197223222	SNORD45B	small nucleolar RNA, C/D box 45B
4096	7982098	7,849260971	0,013636791	0,022384091	5,16335	SNORD109A	small nucleolar RNA, C/D box 109A
4097	7981947	7,849260971	0,013636791	0,022384091	5,16335	SNORD109A	small nucleolar RNA, C/D box 109A
2287	8048071	11,40257805	0,007516391	0,022096472	5,111576264	CPS1-IT1	CPS1 intronic transcript 1 (non-protein coding)
881	7938133	18,96821201	0,002895505	0,021983704	5,023609051	DNHD1	dynein heavy chain domain 1
180	8025522	36,79972512	0,000614863	0,021983704	4,911722536	C3P1	complement component 3 precursor pseudogene
1576	8100798	14,12607462	0,00518242	0,022056024	4,910873388	SULT1B1	sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1
1126	7961173	17,12858901	0,003686043	0,022007311	4,868011804	KLRC4-KLRK1	KLRC4-KLRK1 readthrough
1905	8101728	12,72931843	0,006252157	0,022056024	4,664188676	FAM13A	family with sequence similarity 13, member A
498	8093166	24,0342319	0,001659504	0,021983704	4,620594757	PIGZ	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Z
108	8009951	43,96469746	0,00037331	0,021983704	4,617981355	ITGB4	integrin, beta 4
77	7978544	48,84728403	0,000276061	0,021983704	4,505229764	EGLN3	egl nine homolog 3 (C. elegans)
5993	8156022	5,917762014	0,020365781	0,022853216	4,455233351	LOC642947	uncharacterized LOC642947
1498	7938118	14,57410832	0,004912633	0,022056024	4,447723427	DNHD1	dynein heavy chain domain 1
3518	7961285	8,69429732	0,011654171	0,022271567	4,419122973	TAS2R20	taste receptor, type 2, member 20

Resultados

1337	8029914	15,53226167	0,004379333	0,022007311	4,417504153	C5AR2	complement component 5a receptor 2
2475	8014903	10,88840815	0,00814694	0,022123283	4,373010626	GSDMB	gasdermin B
2773	8073633	10,18563126	0,009141387	0,022169538	4,332529522	PNPLA3	patatin-like phospholipase domain containing 3
937	8129618	18,49609383	0,003080591	0,021983704	4,205240316	VNN1	vanin 1
6091	7944834	5,837365646	0,020710857	0,022870037	4,18915109	OR8G2	olfactory receptor, family 8, subfamily G, member 2
1626	7977933	13,86907164	0,005339273	0,022056024	4,161623231	SLC7A8	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 8
1022	8100758	17,8866156	0,003347241	0,021983704	4,151070753	UGT2B7	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B7
319	8179595	28,96185589	0,001069737	0,021983704	4,06793424	GABBR1	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1
888	8178298	18,88161107	0,002920601	0,021983704	4,045073868	GABBR1	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1
40	7912863	60,82483648	0,000144305	0,021983704	3,994263888	MST1L	macrophage stimulating 1-like
907	8128001	18,74953704	0,002980205	0,021983704	3,949135799	CGA	glycoprotein hormones, alpha polypeptide
798	8027748	19,72071206	0,002628855	0,021983704	3,938092072	FXD3	FXD domain containing ion transport regulator 3
24	7898357	71,52576441	9,09747E-05	0,021983704	3,901872465	MST1P2	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like) pseudogene 2
740	8151092	20,39915394	0,002446905	0,021983704	3,901468477	CRH	corticotropin releasing hormone
645	8020653	21,58440096	0,002142611	0,021983704	3,873414032	CABYR	calcium binding tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated
824	8124654	19,47404137	0,002713555	0,021983704	3,86305797	GABBR1	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1
243	8044813	32,33867045	0,000821909	0,021983704	3,84695153	TMEM37	transmembrane protein 37
54	8153002	55,3610994	0,000191361	0,021983704	3,83098395	NDRG1	N-myc downstream regulated 1
82	8021047	47,95735783	0,000291746	0,021983704	3,829445518	SETBP1	SET binding protein 1
450	7904244	24,80859097	0,001505788	0,021983704	3,81939041	MAB21L3	mab-21-like 3 (C. elegans)
376	8025402	27,07770177	0,00125796	0,021983704	3,819250369	ANGPTL4	angiopoietin-like 4

Resultados

1125	8037205	17,13844651	0,003682906	0,022007311	3,811321271	CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)
2188	7923043	11,68009481	0,007187	0,02208267	3,792982619	KCNT2	potassium channel, subfamily T, member 2
727	8084648	20,54257087	0,002406124	0,021983704	3,723010747	AHSG	alpha-2-HS-glycoprotein
78	8053654	48,58717467	0,000279198	0,021983704	3,646296258	FABP1	fatty acid binding protein 1, liver
279	8049487	30,66266956	0,00093798	0,021983704	3,583811623	MLPH	melanophilin
93	8087611	46,58479778	0,000326254	0,021983704	3,581361543	HYAL1	hyaluronoglucosaminidase 1
1119	7926506	17,17011158	0,003664084	0,022007311	3,576173543	CACNB2	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit
1198	8171758	16,6220751	0,003930734	0,022007311	3,566915859	SCARNA9L	small Cajal body-specific RNA 9-like
11	8095751	144,7084192	4,39188E-05	0,021983704	3,552198926	PARM1	prostate androgen-regulated mucin-like protein 1
4079	8125530	7,866232736	0,013580324	0,022384091	3,536076686	HLA-DMB	major histocompatibility complex, class II, DM beta
397	7973002	26,16924994	0,001326976	0,021983704	3,488339645	FLJ39632	uncharacterized LOC642477
1015	8076113	17,91604138	0,003325282	0,021983704	3,4584499	FAM227A	family with sequence similarity 227, member A
4033	8180078	7,928165588	0,013420334	0,022379765	3,428931682	HLA-DMB	major histocompatibility complex, class II, DM beta
6309	8159385	5,652525431	0,021526492	0,022950208	3,427322976	KIAA1984	KIAA1984
414	8091402	25,74404197	0,001380306	0,021983704	3,412207392	TM4SF18	transmembrane 4 L six family member 18
571	8008885	22,75152872	0,001904194	0,021983704	3,412195992	MIR21	microRNA 21
2092	8053200	11,96475004	0,00686702	0,02207822	3,402728995	DQX1	DEAQ box RNA-dependent ATPase 1
1021	8026300	17,89495572	0,003344104	0,021983704	3,366981859	CD97	CD97 molecule
724	8056611	20,57170695	0,002396712	0,021983704	3,351436003	LRP2	low density lipoprotein receptor-related protein 2
1388	8138592	15,2680502	0,00454246	0,022010753	3,349089887	TRA2A	transformer 2 alpha homolog (Drosophila)
4965	8065948	6,836588223	0,016642093	0,022533161	3,299419273	FER1L4	fer-1-like 4 (C. elegans) pseudogene
21	8100768	77,256598	8,15635E-05	0,021983704	3,299211647	UGT2B10	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B10

Resultados

627	8146687	21,854852	0,002086144	0,021983704	3,287189176	ADHFE1	alcohol dehydrogenase, iron containing, 1
2058	7905571	12,11900268	0,006750949	0,022058975	3,280630409	S100A9	S100 calcium binding protein A9
395	7988414	26,19813884	0,001320701	0,021983704	3,27124392	GATM	glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)
2391	7968872	11,14286387	0,007870879	0,022123283	3,209421123	DNAJC15	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15
284	8110183	30,45574248	0,000953666	0,021983704	3,182132153	CDHR2	cadherin-related family member 2
7037	8071049	5,117617	0,024293378	0,023220633	3,144195166	LINC00328	long intergenic non-protein coding RNA 328
3567	7961166	8,648638203	0,011817298	0,022271567	3,141687399	KLRC4	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4
753	8152719	20,19479205	0,002487687	0,021983704	3,131283792	ANXA13	annexin A13
2192	7961279	11,66701455	0,007202685	0,02208267	3,093986371	TAS2R14	taste receptor, type 2, member 14
47	7985317	59,49436873	0,000166264	0,021983704	3,05777528	KIAA1199	KIAA1199
4539	8095430	7,298644777	0,015136305	0,022427872	3,040304879	HTN3	histatin 3
629	8077958	21,83828348	0,002092418	0,021983704	3,030752438	HDAC11	histone deacetylase 11
6240	7907531	5,71162857	0,021272391	0,022926316	2,973850119	GPR52	G protein-coupled receptor 52
3729	7931473	8,386159539	0,012363146	0,022297103	2,967045337	C10orf91	chromosome 10 open reading frame 91
2715	8077612	10,32613838	0,008940615	0,022145833	2,958683644	TTL3	tubulin tyrosine ligase-like family, member 3
1311	8017766	15,70909378	0,004294632	0,022007311	2,956999717	APOH	apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)
1831	7951032	12,93056606	0,006016877	0,022056024	2,955025862	SNORA1	small nucleolar RNA, H/ACA box 1
1240	8113709	16,21522705	0,004065627	0,022007311	2,952958294	LOX	lysyl oxidase
41	7947744	60,30647306	0,000147442	0,021983704	2,952061813	LRP4	low density lipoprotein receptor-related protein 4
411	8113214	25,88645192	0,001370894	0,021983704	2,951585721	GLRX	glutaredoxin (thioltransferase)
3550	8144228	8,66265238	0,011763968	0,022271567	2,936179478	FLJ36840	uncharacterized LOC645524
7294	7991598	4,914369534	0,025338018	0,023364541	2,925964647	SNRPA1	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'

Resultados

5956	8169836	5,943454837	0,02022775	0,022844008	2,925165482	XPNPEP2	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2, membrane-bound
1217	8135069	16,42961241	0,003993475	0,022007311	2,923214958	SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
777	7961455	19,92533797	0,002562976	0,021983704	2,907579087	GUCY2C	guanylate cyclase 2C (heat stable enterotoxin receptor)
2660	7961287	10,44084948	0,008758666	0,022133981	2,906292626	TAS2R19	taste receptor, type 2, member 19
1364	8091778	15,38227852	0,004464034	0,022007311	2,889179502	SCARNA7	small Cajal body-specific RNA 7
3900	8097801	8,11733365	0,012959187	0,022349779	2,8875848	FAM160A1	family with sequence similarity 160, member A1
6436	7952986	5,554676569	0,021978229	0,022967134	2,879519417	WNK1	WNK lysine deficient protein kinase 1
717	8167185	20,62724928	0,002374753	0,021983704	2,877354819	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
285	7956301	30,43653795	0,000956803	0,021983704	2,863854813	LRP1	low density lipoprotein receptor-related protein 1
1818	7961281	12,98787556	0,005976096	0,022056024	2,83717315	TAS2R50	taste receptor, type 2, member 50
3357	8010978	8,966379161	0,011102048	0,022244882	2,828655852	LOC100130876	uncharacterized LOC100130876
94	8137526	46,44473196	0,000329391	0,021983704	2,823677414	INSIG1	insulin induced gene 1
4573	7961291	7,257614873	0,015255513	0,022439008	2,794617589	TAS2R31	taste receptor, type 2, member 31
599	7951030	22,3725827	0,001995169	0,021983704	2,791932617	SNORD6	small nucleolar RNA, C/D box 6
5216	8180360	6,608435844	0,017523606	0,022595467	2,79046262	OR8G1	olfactory receptor, family 8, subfamily G, member 1
4782	8112731	7,016837395	0,016011544	0,022521789	2,785950904	F2RL2	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2
3328	7909990	9,031691558	0,011011074	0,022244882	2,783143234	LOC100287934	uncharacterized LOC100287934
315	7949503	29,07183141	0,001057189	0,021983704	2,759182715	EFEMP2	EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 2
926	8072876	18,60506563	0,003046083	0,021983704	2,756238232	LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1
2258	8054054	11,47443909	0,007419142	0,022093235	2,747587331	ANKRD36B	ankyrin repeat domain 36B
6767	7904478	5,30956359	0,023255011	0,023110858	2,743485777	LINC00328	long intergenic non-protein coding RNA 328

Resultados

4064	8078605	7,887301895	0,013526994	0,022384091	2,738393319	C3orf35	chromosome 3 open reading frame 35
5019	7924817	6,797869201	0,016814631	0,022533161	2,73144032	PRO2012	uncharacterized protein PRO2012
4689	8041168	7,12163342	0,015675879	0,022486674	2,728439976	SNORD53	small nucleolar RNA, C/D box 53
456	7985934	24,7119508	0,00152461	0,021983704	2,725620486	SEMA4B	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4B
8039	7908488	4,443414977	0,028468802	0,023818879	2,721490856	CFHR1	complement factor H-related 1
5446	8132439	6,390945133	0,018345516	0,022658246	2,702595667	C7orf10	chromosome 7 open reading frame 10
2510	7896754	10,79017252	0,008266148	0,022123283	2,692719178	LOC100287934	uncharacterized LOC100287934
2827	7960544	10,06810179	0,009329611	0,022181314	2,692115398	VAMP1	vesicle-associated membrane protein 1 (synaptobrevin 1)
1196	8087447	16,63386543	0,00392446	0,022007311	2,678765774	MST1	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)
2097	7985248	11,94949309	0,00688898	0,02208267	2,675293625	KIAA1024	KIAA1024
289	7964246	30,32306076	0,000969351	0,021983704	2,665071282	SNORD59B	small nucleolar RNA, C/D box 59B
2465	7960728	10,93834214	0,008115569	0,022123283	2,657551496	SCARNA12	small Cajal body-specific RNA 12
3286	8049349	9,097976068	0,01087618	0,022244882	2,656398318	UGT1A1	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1
3500	8104139	8,718256865	0,01159143	0,022271567	2,654693474	LOC389834	ankyrin repeat domain 57 pseudogene
993	8068361	18,08670519	0,003256266	0,021983704	2,649227241	SLC5A3	solute carrier family 5 (sodium/myo-inositol cotransporter), member 3
7463	8136645	4,804182198	0,026028171	0,023458991	2,648520793	TAS2R4	taste receptor, type 2, member 4
380	7926368	26,98490292	0,001270509	0,021983704	2,638244156	VIM	vimentin
306	8071861	29,39998616	0,001025818	0,021983704	2,630085843	SUSD2	sushi domain containing 2
406	7902565	25,94394384	0,001355209	0,021983704	2,607634898	LPHN2	latrophilin 2
271	7974461	31,04447957	0,000912884	0,021983704	2,607582667	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
496	8046408	24,05797888	0,00165323	0,021983704	2,606739308	PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1

Resultados

2210	8042195	11,61299139	0,007259152	0,02208267	2,595274113	AHSA2	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2 (yeast)
1378	7987279	15,3218692	0,00451109	0,022010753	2,592160283	GOLGA8B	golgin A8 family, member B
1056	7987248	17,62692797	0,003453901	0,021983704	2,589349186	GOLGA8B	golgin A8 family, member B
2527	8043697	10,74720273	0,008325752	0,022123283	2,586596782	ANKRD36B	ankyrin repeat domain 36B
874	8062728	19,07908947	0,002873545	0,021983704	2,574354776	SGK2	serum/glucocorticoid regulated kinase 2
2402	7935188	11,10211859	0,007908523	0,022123283	2,56894525	SORBS1	sorbin and SH3 domain containing 1
622	7902396	21,89471208	0,002070458	0,021983704	2,556575493	SNORD45C	small nucleolar RNA, C/D box 45C
6556	7929478	5,45548561	0,022451925	0,023032636	2,550176929	CYP2C19	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19
8548	8043687	4,148549433	0,030777677	0,024219005	2,542449544	ANKRD36	ankyrin repeat domain 36
721	8172722	20,57668721	0,002390438	0,021983704	2,541077364	MAGED4	melanoma antigen family D, 4
722	8167673	20,57668721	0,002390438	0,021983704	2,541077364	MAGED4	melanoma antigen family D, 4
1362	8098204	15,39541898	0,00445776	0,022007311	2,536335958	CPE	carboxypeptidase E
503	8063923	23,98624109	0,001675189	0,021983704	2,526701179	SLCO4A1	solute carrier organic anion transporter family, member 4A1
1221	8073015	16,39977412	0,004006023	0,022007311	2,525103678	KDEL3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3
1507	7914216	14,54864242	0,004947141	0,022056024	2,523725729	SNORA16A	small nucleolar RNA, H/ACA box 16A
5141	8001748	6,670372537	0,017272642	0,022591291	2,522468596	SNORA50	small nucleolar RNA, H/ACA box 50
6847	8160912	5,251699752	0,023546758	0,023131544	2,521863427	C9orf131	chromosome 9 open reading frame 131
872	7970251	19,10123785	0,002867271	0,021983704	2,518257769	PROZ	protein Z, vitamin K-dependent plasma glycoprotein
4224	7981976	7,659976118	0,014069705	0,022403516	2,513192951	SNORD116-14	small nucleolar RNA, C/D box 116-14
674	7929466	21,14616391	0,002236722	0,021983704	2,496846987	CYP2C18	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18
144	8111915	39,62633929	0,000501929	0,021983704	2,492837544	SEPP1	selenoprotein P, plasma, 1

Resultados

1871	8171760	12,82412336	0,00614236	0,022056024	2,491747881	SCARNA9L	small Cajal body-specific RNA 9-like
4858	8150877	6,938921595	0,016278194	0,022533161	2,488328318	SNORD54	small nucleolar RNA, C/D box 54
113	8053834	43,32472824	0,000395269	0,021983704	2,479350674	ANKRD36B	ankyrin repeat domain 36B
3497	8135902	8,719461457	0,011578881	0,022271497	2,471290542	SND1-IT1	SND1 intronic transcript 1 (non-protein coding)
2789	7989476	10,16710912	0,009194717	0,022174802	2,465210186	FLJ38723	uncharacterized FLJ38723
1979	8140782	12,42446619	0,006490573	0,022056024	2,464031258	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
781	8065920	19,89866268	0,002575525	0,021983704	2,459759288	FER1L4	fer-1-like 4 (C. elegans) pseudogene
804	8135915	19,66601852	0,002647677	0,021983704	2,450939532	HILPDA	hypoxia inducible lipid droplet-associated
1530	7980316	14,42462631	0,005019293	0,022056024	2,449833981	TGFB3	transforming growth factor, beta 3
7846	8131042	4,557751157	0,027609248	0,02366929	2,444270879	FLJ44124	uncharacterized LOC641737
4365	8059708	7,49947354	0,014555949	0,022421244	2,443312633	SNORA75	small nucleolar RNA, H/ACA box 75
290	8075924	30,32268205	0,000972488	0,021983704	2,441926498	MFNG	MFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase
480	8137739	24,27716831	0,0015999	0,021983704	2,439796145	INTS1	integrator complex subunit 1
7312	7908312	4,899207074	0,025419582	0,023383289	2,43160898	PRG4	proteoglycan 4
3129	8092691	9,429899876	0,010330332	0,022206488	2,424865477	BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6
6042	8038326	5,887354721	0,020532045	0,02285733	2,4225052	SLC6A16	solute carrier family 6, member 16
751	8017599	20,24916029	0,002481413	0,021983704	2,41950695	PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
176	8086961	37,17789854	0,000602315	0,021983704	2,417650149	PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4
1335	7938880	15,54041069	0,004373059	0,022007311	2,414851945	HTATIP2	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa
4490	7925561	7,360288143	0,014970041	0,022426506	2,413601958	COX20	COX20 Cox2 chaperone homolog (S. cerevisiae)
8005	7969794	4,464522498	0,028283716	0,023765886	2,402588364	LOC100132099	FRSS1829
934	8157727	18,51619214	0,00307118	0,021983704	2,39792476	GPR21	G protein-coupled receptor 21

Resultados

5369	8013268	6,465444163	0,018072592	0,022640994	2,396642288	FAM106A	family with sequence similarity 106, member A
1566	7964927	14,20469081	0,005147912	0,022056024	2,390264271	TSPAN8	tetraspanin 8
3397	8053801	8,901151371	0,011236942	0,022248023	2,384087545	ANKRD36	ankyrin repeat domain 36
4058	8045030	7,896720935	0,013501898	0,022379765	2,379410702	MYO7B	myosin VIIB
1093	7938390	17,31083801	0,003576246	0,022003636	2,375597672	ADM	adrenomedullin
3150	7911799	9,382241026	0,010408759	0,022224755	2,374900999	MEGF6	multiple EGF-like-domains 6
2349	8025601	11,24524388	0,007726574	0,022123283	2,371563347	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
3292	8141843	9,085891658	0,01089814	0,022244882	2,369274714	RASA4	RAS p21 protein activator 4
2421	8084708	11,03971198	0,007971265	0,022123283	2,354165692	SNORA4	small nucleolar RNA, H/ACA box 4
6770	7946286	5,30740763	0,023264423	0,023110858	2,348539069	OR2D2	olfactory receptor, family 2, subfamily D, member 2
4076	7903022	7,871862581	0,013570913	0,022384091	2,347295276	SNORD21	small nucleolar RNA, C/D box 21
5239	8005687	6,58789113	0,017611444	0,022605305	2,343299058	FAM106A	family with sequence similarity 106, member A
1978	8120719	12,42514256	0,006487436	0,022056024	2,341402481	CD109	CD109 molecule
773	7973084	19,96345698	0,002550428	0,021983704	2,340473434	ANG	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5
3171	8048205	9,345780312	0,010477774	0,022224755	2,335125819	IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa
2050	8031176	12,14377825	0,006725852	0,022058975	2,334538201	LENG8	leukocyte receptor cluster (LRC) member 8
754	7971565	20,18864423	0,002490824	0,021983704	2,334268516	LPAR6	lysophosphatidic acid receptor 6
1879	8084496	12,80912326	0,006167456	0,022056024	2,331303626	CHRD	chordin
533	7970241	23,44884664	0,001775575	0,021983704	2,328525308	F10	coagulation factor X
294	8106280	30,12960295	0,000985036	0,021983704	2,319951085	HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
611	8068353	22,16912401	0,002035951	0,021983704	2,317442699	SLC5A3	solute carrier family 5 (sodium/myo-inositol cotransporter), member 3
1030	8100784	17,82832869	0,003372337	0,021983704	2,316240801	UGT2B4	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B4

Resultados

1239	8091283	16,21572816	0,00406249	0,022007311	2,302225139	PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2
1601	8044766	13,98175394	0,005260846	0,022056024	2,301868533	INSIG2	insulin induced gene 2
4856	8089596	6,941511258	0,01627192	0,022533161	2,296414689	WDR52	WD repeat domain 52
5247	8005231	6,580997544	0,01763654	0,022605305	2,291285481	FAM106CP	family with sequence similarity 106, member C pseudogene
835	8129937	19,3982569	0,002748063	0,021983704	2,287073037	CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2
1859	8074856	12,8529624	0,006104715	0,022056024	2,282992069	PRAME	preferentially expressed antigen in melanoma
5349	8131263	6,47483577	0,018006713	0,022640994	2,282031064	SNORD13P2	small nucleolar RNA, C/D box 13 pseudogene 2
3578	8110666	8,624627149	0,011854942	0,022271567	2,280782363	TRIM52	tripartite motif containing 52
4971	7977456	6,831630897	0,016660915	0,022533161	2,275764858	POTEG	POTE ankyrin domain family, member G
607	8083240	22,22934135	0,002020265	0,021983704	2,272518498	AGTR1	angiotensin II receptor, type 1
297	8074927	29,90872713	0,000994447	0,021983704	2,27018732	GUSBP11	glucuronidase, beta pseudogene 11
3305	8123658	9,060602422	0,010938921	0,022244882	2,270089475	SLC22A23	solute carrier family 22, member 23
1323	8102328	15,60406007	0,004332277	0,022007311	2,265175166	CFI	complement factor I
523	7967210	23,5493576	0,00173793	0,021983704	2,260190613	LOC338799	uncharacterized LOC338799
8837	8162884	4,007234655	0,032098378	0,024431482	2,256831679	ALDOB	aldolase B, fructose-bisphosphate
1245	7920664	16,16458872	0,004081313	0,022007311	2,255054779	THBS3	thrombospondin 3
4732	7972983	7,084000393	0,015829595	0,022500539	2,244155851	POTEM	POTE ankyrin domain family, member M
1457	8180086	14,84007694	0,004771465	0,02201175	2,244119972	HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha
1458	8178884	14,84007694	0,004771465	0,02201175	2,244119972	HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha
1427	8123364	15,02912421	0,004674217	0,02201175	2,243264134	CCR6	chemokine (C-C motif) receptor 6
1709	8041204	13,48763199	0,005627882	0,022056024	2,242720148	SNORA10	small nucleolar RNA, H/ACA box 10
1710	7998664	13,48763199	0,005627882	0,022056024	2,242720148	SNORA10	small nucleolar RNA, H/ACA box 10

Resultados

5167	7980891	6,648850196	0,017357342	0,022591291	2,234778516	TC2N	tandem C2 domains, nuclear
1321	8078014	15,60655477	0,004326003	0,022007311	2,231799192	SLC6A6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6
989	7922174	18,14272172	0,003243718	0,021983704	2,224010953	F5	coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)
4615	8074170	7,213627445	0,015396681	0,022440035	2,213651756	POTEM	POTE ankyrin domain family, member M
10390	8120271	3,257051602	0,041060953	0,026582661	2,212811384	FBXO9	F-box protein 9
2719	8030366	10,30891874	0,008953164	0,022145833	2,210086118	SNORD35A	small nucleolar RNA, C/D box 35A
5486	8166747	6,350627232	0,018499231	0,022682079	2,20858639	SYTL5	synaptotagmin-like 5
864	8180326	19,16791913	0,002842175	0,021983704	2,207540935	BAGE4	B melanoma antigen family, member 4
5824	7944843	6,050784875	0,019732095	0,022788736	2,206107681	OR8A1	olfactory receptor, family 8, subfamily A, member 1
1112	8155083	17,20192053	0,003642124	0,022007311	2,204537192	CA9	carbonic anhydrase IX
3205	8112033	9,268897441	0,010593845	0,02223082	2,203739414	ARL15	ADP-ribosylation factor-like 15
2553	7951036	10,68144392	0,008407316	0,022123283	2,201887115	SNORD5	small nucleolar RNA, C/D box 5
1213	8138527	16,4436804	0,003980927	0,022007311	2,201673388	STEAP1B	STEAP family member 1B
5392	8069487	6,44213181	0,018160429	0,022648251	2,200874915	BAGE2	B melanoma antigen family, member 2
1543	8125537	14,35146497	0,005066349	0,022056024	2,200599296	HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha
4581	7942594	7,249250687	0,015283747	0,022439008	2,199685333	SNORD15B	small nucleolar RNA, C/D box 15B
3584	8111932	8,613255637	0,011873765	0,022271567	2,195732256	CCL28	chemokine (C-C motif) ligand 28
3148	7935780	9,392083293	0,010402485	0,022224755	2,193561125	SEC31B	SEC31 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
1287	7961175	15,88707342	0,004219343	0,022007311	2,192757391	KLRC3	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3
5364	7962895	6,466328444	0,018056906	0,022640994	2,191627905	FKBP11	FK506 binding protein 11, 19 kDa
1279	8082797	15,91923112	0,00419111	0,022007311	2,191263199	TF	transferrin
12813	7908861	2,359557037	0,070543025	0,037031699	2,183382946	OCR1	ovarian cancer-related protein 1

Resultados

1289	8180328	15,8767722	0,004225617	0,022007311	2,178032054	BAGE2	B melanoma antigen family, member 2
7283	8123843	4,9236914	0,025287825	0,023354409	2,17688103	OFCC1	orofacial cleft 1 candidate 1
1462	7920928	14,81299876	0,004787151	0,022021162	2,17658323	PAQR6	progesterone and adipoQ receptor family member VI
10922	8120269	3,038305914	0,044947768	0,027681583	2,176571543	FBXO9	F-box protein 9
805	8177544	19,66086069	0,002650814	0,021983704	2,171711006	GUSBP3	glucuronidase, beta pseudogene 3
4367	8062461	7,498550867	0,014562224	0,022421244	2,170448018	LBP	lipopolysaccharide binding protein
667	8163775	21,25868788	0,002214763	0,021983704	2,169179982	MEGF9	multiple EGF-like-domains 9
10866	8096704	3,060763	0,044521128	0,027558952	2,166223038	NPNT	nephronectin
1001	8180325	18,06645187	0,003281363	0,021983704	2,165180261	BAGE5	B melanoma antigen family, member 5
5161	7990027	6,65243133	0,017335383	0,022591291	2,163996615	ANP32A-IT1	ANP32A intronic transcript 1 (non-protein coding)
197	7935230	35,03159506	0,000668193	0,021983704	2,161294062	ALDH18A1	aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1
42	8047778	60,0402026	0,000150579	0,021983704	2,161157717	SNORD51	small nucleolar RNA, C/D box 51
521	8111941	23,58160149	0,001731656	0,021983704	2,15594053	HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)
1694	7975779	13,56398938	0,005568278	0,022056024	2,152434121	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
744	8173979	20,35114985	0,002459454	0,021983704	2,150392388	NOX1	NADPH oxidase 1
9684	8045423	3,589284085	0,036590645	0,025415148	2,150021562	SNORA40	small nucleolar RNA, H/ACA box 40
833	8167749	19,42312495	0,002741789	0,021983704	2,14799202	FAM156A	family with sequence similarity 156, member A
6536	7981960	5,476934569	0,022367224	0,023017458	2,145083883	SNORD116-6	small nucleolar RNA, C/D box 116-6
1163	8139977	16,83447054	0,003814663	0,022007311	2,143173021	STAG3L3	stromal antigen 3-like 3
758	8009526	20,14469591	0,002503372	0,021983704	2,140589772	SSTR2	somatostatin receptor 2
616	8141950	22,04159446	0,002051636	0,021983704	2,140074219	RELN	reelin
869	8112564	19,14926035	0,00285786	0,021983704	2,135574946	GUSBP3	glucuronidase, beta pseudogene 3

Resultados

7772	8133961	4,600444324	0,027311228	0,023634882	2,134693461	RUNDC3B	RUN domain containing 3B
3250	8062190	9,171102527	0,010750698	0,022244882	2,133408413	SPAG4	sperm associated antigen 4
100	7991602	45,5191681	0,000348213	0,021983704	2,130494259	PCSK6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6
2340	8058869	11,25990184	0,00769834	0,022123283	2,129214982	TNS1	tensin 1
3118	8165345	9,462652209	0,010292688	0,022201858	2,122296232	ABCA2	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2
4117	8018975	7,821654186	0,013705807	0,022384091	2,121915891	LGALS3BP	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein
545	8132036	23,22057893	0,001816357	0,021983704	2,120306136	WIPF3	WAS/WASL interacting protein family, member 3
2022	8106354	12,26614784	0,006638015	0,022058975	2,117826267	IQGAP2	IQ motif containing GTPase activating protein 2
1288	8140196	15,87867916	0,00422248	0,022007311	2,11571797	STAG3L2	stromal antigen 3-like 2
8510	7956522	4,167804115	0,030602001	0,024187931	2,111671852	KIF5A	kinesin family member 5A
3976	8055952	8,003547855	0,013225837	0,022373014	2,111634438	NR4A2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2
1152	8112469	16,91235409	0,003777018	0,022007311	2,111311376	GUSBP3	glucuronidase, beta pseudogene 3
2228	8108006	11,57068318	0,007315619	0,02208267	2,111141309	LEAP2	liver expressed antimicrobial peptide 2
3151	8009301	9,38069704	0,010411896	0,02224755	2,108664866	PRKCA	protein kinase C, alpha
882	7993458	18,96760849	0,002898642	0,021983704	2,107598172	C16orf45	chromosome 16 open reading frame 45
20	8059955	77,37089702	7,84265E-05	0,021983704	2,107134815	RAB17	RAB17, member RAS oncogene family
7522	7978260	4,765194359	0,026288547	0,023508137	2,106337748	DHRS1	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1
1909	8129666	12,71781065	0,006264705	0,022056024	2,103832294	SLC2A12	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 12
164	8034108	37,90351073	0,00056467	0,021983704	2,103519639	YIPF2	Yip1 domain family, member 2
8151	8100808	4,375205339	0,028955046	0,023894179	2,102882513	SULT1E1	sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1
1535	8054308	14,38698648	0,005041252	0,022056024	2,102304825	TBC1D8	TBC1 domain family, member 8 (with GRAM domain)
945	8133610	18,46547362	0,003105687	0,021983704	2,10167715	STAG3L3	stromal antigen 3-like 3

Resultados

5636	7938366	6,214996152	0,019032531	0,022714885	2,099854752	WEE1	WEE1 homolog (S. pombe)
1025	7900488	17,87470915	0,003356652	0,021983704	2,099130707	MIR30E	microRNA 30e
322	7931852	28,87215155	0,001079148	0,021983704	2,098179593	TUBAL3	tubulin, alpha-like 3
1065	8076223	17,52555733	0,003482134	0,021983704	2,091352463	SNORD43	small nucleolar RNA, C/D box 43
277	8151795	30,82774581	0,000931706	0,021983704	2,090899155	CDH17	cadherin 17, LI cadherin (liver-intestine)
2973	7961182	9,753214353	0,009806444	0,02218533	2,085611632	KLRC2	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2
2448	8139482	10,96691968	0,008059102	0,022123283	2,084833974	SNORA5A	small nucleolar RNA, H/ACA box 5A
3949	8013272	8,032877464	0,013137999	0,022373014	2,080781507	CCDC144A	coiled-coil domain containing 144A
1867	7961891	12,82847315	0,006129811	0,022056024	2,073810516	BHLHE41	basic helix-loop-helix family, member e41
5752	8010137	6,111543155	0,019446623	0,022740183	2,071775656	SCARNA16	small Cajal body-specific RNA 16
1023	7986428	17,88057544	0,003350378	0,021983704	2,071135344	LOC400464	uncharacterized LOC400464
802	7991374	19,67651538	0,002641403	0,021983704	2,067102299	IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial
1787	7912839	13,11354093	0,00587571	0,022056024	2,064690109	CROCCP2	ciliary rootlet coiled-coil, rootletin pseudogene 2
2157	8180327	11,75617156	0,007086614	0,02208267	2,062109747	BAGE3	B melanoma antigen family, member 3
3755	7937314	8,335967885	0,012447846	0,022297103	2,059127516	ATHL1	ATH1, acid trehalase-like 1 (yeast)
1039	8139488	17,78013744	0,003400571	0,021983704	2,058384016	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
2449	7981986	10,96594201	0,008065376	0,022123283	2,051851027	SNORD116-17	small nucleolar RNA, C/D box 116-17
2450	7981982	10,96594201	0,008065376	0,022123283	2,051851027	SNORD116-17	small nucleolar RNA, C/D box 116-17
3077	8159006	9,540060713	0,010157794	0,022196767	2,049855501	SNORD36B	small nucleolar RNA, C/D box 36B
8349	8070421	4,260758446	0,02984597	0,02404528	2,048220343	DSCAM	Down syndrome cell adhesion molecule
11363	7961151	2,868603562	0,048875365	0,028932234	2,046612075	KLRK1	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1
917	8177669	18,66723272	0,003014713	0,021983704	2,042840441	GUSBP3	glucuronidase, beta pseudogene 3

Resultados

2105	7961187	11,91687022	0,00692035	0,02208267	2,0419179	KLRC1	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1
3316	7951034	9,046765963	0,010973429	0,022244882	2,040674361	SNORA8	small nucleolar RNA, H/ACA box 8
846	8172813	19,30021706	0,002782571	0,021983704	2,039697658	FAM156A	family with sequence similarity 156, member A
5467	7921344	6,37010605	0,018427079	0,022671272	2,031404962	ELL2	elongation factor, RNA polymerase II, 2
1052	8070286	17,65905122	0,003441353	0,021983704	2,030458659	DSCR4	Down syndrome critical region gene 4
1167	8113003	16,80203078	0,003827211	0,022007311	2,029871851	FLJ11292	uncharacterized protein FLJ11292
2890	7910047	9,922579844	0,009536657	0,022181314	2,029863737	DNAH14	dynein, axonemal, heavy chain 14
942	8179291	18,47153146	0,00310255	0,021983704	2,027112093	APOM	apolipoprotein M
943	8178043	18,47153146	0,00310255	0,021983704	2,027112093	APOM	apolipoprotein M
944	8118209	18,47153146	0,00310255	0,021983704	2,027112093	APOM	apolipoprotein M
990	8150988	18,12097927	0,003246855	0,021983704	1,817934199	ASPH	aspartate beta-hydroxylase
3267	7929779	9,141286693	0,010810302	0,022244882	1,39687915	ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2
6342	8020795	5,628005787	0,021645701	0,022955759	1,31528913	TTR	transthyretin
10766	8173189	3,103149758	0,043727452	0,027320256	1,191016421	SPIN2B	spindlin family, member 2B
9294	8035351	3,78297025	0,034422938	0,024913241	1,136724234	JAK3	Janus kinase 3
12619	8095744	2,42677261	0,066530727	0,035461282	1,108050897	AREG	amphiregulin

Capítulo 5: Discusión

La apoptosis es un conjunto de eventos fisiológicos en el cual las células siguen un proceso de muerte filogenéticamente conservado y bioquímicamente estereotipado. En años recientes se ha visto un considerable aumento en el conocimiento relacionado con las vías centrales de la apoptosis en el cáncer, así como su papel en la supervivencia celular y la resistencia a los fármacos. En la actualidad se han empezado a entender e identificar como objetivos clínicos estas vías clave.

Desde su descubrimiento, los alquilfosfolípidos han sido una herramienta de investigación debido a sus propiedades antitumorales y en especial la edelfosina [154, 193, 194], cuyo mecanismo de acción ha resultado ser la activación de la maquinaria apoptótica en las células tumorales de manera selectiva [162, 163, 171-173, 195, 196].

Datos previos de nuestro laboratorio demuestran que la edelfosina actúa a distintos niveles y compartimentos celulares de acuerdo al tipo tumoral, y desde ahí es responsable de desencadenar rutas de señalización que finalmente llevan a las células a sufrir un proceso de muerte [194].

En tumores hematológicos la acción de la edelfosina se dirige a través del reclutamiento de receptores de muerte FAS/CD95 y TRAIL, en microdominios lipídicos de membrana tipo “rafts” [154, 171, 173, 175, 197, 198], mientras que en tumores de tipo sólido el mecanismo principal está focalizado en generar estrés en el retículo endoplásmico [159, 160, 162, 176].

5.1 Caracterización de la muerte celular en líneas de cáncer de hígado.

La edelfosina induce distintos tipos de muerte celular en líneas de cáncer hepático

En este trabajo realizamos una serie de estudios enfocados a discernir el tipo de daño que podía ocasionar la edelfosina en distintas líneas de cáncer hepático, ya que éste tipo de padecimiento en años recientes se ha posicionado como uno de los de peor pronóstico, con unos bajos índices de supervivencia y actualmente es el quinto más abundante en las muertes por tipo de cáncer a nivel mundial, buscando de esta manera ubicar a la edelfosina como una posible alternativa terapéutica al tratamiento actual del carcinoma hepatocelular.

Nuestros resultados indican que la edelfosina induce distintos tipos de muerte celular en un mismo tipo de cáncer, en éste caso cáncer hepático, teniendo en cuenta las observaciones morfológicas llevadas a cabo, los análisis mediante técnicas citométricas y los estudios bioquímicos. Para el caso de la línea celular

HepG2, al ser tratada con edelfosina, a la dosis que se determinó como letal a las 24 horas de tratamiento, sufrió un proceso apoptótico típico, puesto que mediante un análisis por citometría de flujo pudimos comprobar un estado de degradación en el DNA, la cuál es una característica del proceso apoptótico. Por otro lado, se observó la activación de proteínas típicas en este tipo de procesos, como la caspasa-3 y la fragmentación de su diana PARP. Además pudimos comprobar que el proceso apoptótico originado en esta línea es dependiente de caspasas, puesto que mediante la inhibición bioquímica de la familia de las caspasas se pudo observar un marcado descenso en el porcentaje de células en fase de apoptosis. En la línea celular Huh7 todo parece apuntar a que sufre una muerte celular combinada, puesto que al igual que las células HepG2, muestra elevados niveles de degradación de DNA al ser tratada con edelfosina, así como la activación de proteínas típicas en procesos de apoptosis (caspasa-3 y PARP). Sin embargo al ser inhibida la familia de las caspasas no se observó una disminución significativa en el porcentaje de células en fase sub-G₀/G₁, poniendo de manifiesto el hecho de que la muerte generada en esta línea no es dependiente de caspasas y que adicionalmente a la apoptosis son otra u otras las rutas alternativas de muerte que se encuentran activadas, las cuáles se identificarán más adelante en este trabajo. La línea PLC/PRF/5 celular, la cual resultó ser la más resistente al tratamiento con edelfosina, mostró desde el principio en los análisis citométricos que la degradación en el DNA era relativamente baja, y adicionalmente se podían detectar los indicadores de activación de proteínas clásicas en procesos apoptóticos, incluso trans incubaciones prolongadas, y al igual que en la línea Huh7, la inhibición general de las caspasas no resultó ser suficiente para disminuir la población de células apoptóticas, sugiriendo que la ruta de muerte activada en esta línea celular no es una respuesta típicamente apoptótica.

5.2 Necrosis y autofagia

Determinados procesos morfológicos característicos en las células ponen de manifiesto el proceso de muerte que sufren, entre ellos la integridad de la membrana celular, que es sin duda el indicador más importante de un proceso de necrosis [150, 199].

Mediante ensayos de incorporación de yoduro de propidio en células sin permeabilizar, se observó que la edelfosina induco un aumento de la permeabilidad de la membrana en las células PLC/PRF/5 y Huh7, que no era inhibida por el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk, lo cual es una característica de un proceso de necrosis. Estos datos sugieren que otros procesos de muerte como la necrosis se inducían en estas líneas celulares al ser

tratadas con edelfosina, o bien que la sensibilidad por parte de esas líneas celulares era distinta, siendo más probable la existencia de procesos necróticos. En otro tipo de tumores como los de mama y glioblastoma, también se ha visto que procesos necróticos están presentes como una ruta que la célula tumoral sigue al ser tratada con edelfosina, trabajos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio así lo demuestran [200, 201]

La autofagia, es un proceso evolutivamente conservado y es el responsable no solo de la degradación de proteínas (como fue inicialmente descrita) sino también del reciclaje y degradación de orgánulos y material citoplasmático [202-204], es un proceso que participa en varias enfermedades como el cáncer [205] y enfermedades neurodegenerativas [206], entre otras. Quisimos saber si la autofagia tenía algún papel en la muerte celular y por lo tanto sería un proceso de muerte, ó si por el contrario, tenía algún papel en los fenómenos de resistencia al tratamiento en las líneas resistentes al tratamiento con edelfosina. Estudiamos la lipidación de la proteína LC3 como marcador de autofagia a nivel protéico, ya que está directamente asociado con el proceso de formación de los autofagosomas [207]. Tras el tratamiento con edelfosina se detectó una importante acumulación de LC3 asociada a fostatidieletanolamina (PE), o forma II, en las líneas más resistentes o menos sensibles al tratamiento con edelfosina (PLC/PRF/5 y Huh7). Al inhibir el proceso autofágico con inhibidores lisosomales que impiden la degradación de los autofagosomas (cloroquina y bafilomicina), en los experimentos realizados por western blot, observamos un aumento en la formación de LC3 II tras la combinación de la edelfosina con los inhibidores lisosomales cloroquina y bafilomicina, indicando la inducción de autofagia por el éter-lípido [208].

Puesto que el tratamiento con edelfosina produce autofagia en las células PLC/PRF/5 y Huh7, y que no ejerce un papel en la muerte celular; la autofagia participa como un mecanismo de bloqueo en los tipos de muerte que la edelfosina induce en las células, y que la resistencia de las líneas celulares a la edelfosina se ve afectada al inhibir la autofagia, ya que la sensibilidad de estas líneas aumenta al tratamiento con edelfosina.

5.3 Papel del calcio intracelular y del estrés del retículo endoplásmico en la inducción de muerte celular por edelfosina en células de cáncer de hígado

En estudios llevados a cabo con anterioridad en nuestro grupo, ha sido descrito que existe una relación entre la variación en la concentración del calcio citosólico producido por la edelfosina, y la relación que podía tener con la apoptosis [159, 162, 176], y puesto que este proceso podría activar de manera

simultanea varias rutas de muerte, decidimos estudiar su implicación en la muerte generada por edelfosina en las líneas de cáncer de hígado. Los resultados obtenidos del experimento de medición de calcio intracelular con la sonda Fluo-4 mostraron que en las líneas celulares PLC/PRF/5 y HepG2, se había producido un aumento importante en la concentración de calcio citosólico dependiente del tiempo de tratamiento con edelfosina. Mediante el secuestro del calcio intracelular, y realizando el análisis de ciclo celular, se encontró que esa eliminación de calcio era suficiente para disminuir de manera significativa el porcentaje de células apoptóticas en la línea HepG2. Estos resultados sugieren que un incremento en la concentración del calcio libre intracelular puede tener un papel en el mecanismo de acción de la edelfosina en estas células. Sin embargo para la línea más resistente al tratamiento con edelfosina PLC/PRF/5, por el contrario, esa privación de calcio no representó una disminución significativa en la muerte, indicando que probablemente el calcio no sea un factor clave en la muerte celular inducida en éstas células.

Otros trabajos, describen que un aumento en la concentración de calcio en el citoplasma puede ser un factor determinante para la muerte celular y también para la implicación de distintos compartimentos celulares, como el RE o la mitocondria, produciendo un aumento de ROS y favoreciendo una apertura en los poros de transición de permeabilidad mediado por calcio [209].

El RE representa el principal compartimento celular encargado del almacenamiento masivo del calcio, y en estudios previos se ha reportado que la edelfosina originaba un estrés en el RE en varios tumores sólidos [159, 162, 176], debido a su acumulación en esta localización celular. Considerando muy posiblemente que en la línea celular HepG2 estuviese ocurriendo el mismo fenómeno, determinamos varios marcadores de estrés de RE mediante western blot, como la activación de la caspasa 4 y otras proteínas características de estrés en el retículo como el factor de transcripción CHOP-GADD153 encargado de la síntesis de proteínas, y GRP78 que es una proteína que se activa luego de un estrés en el retículo como respuesta a proteínas no plegadas o del inglés UPR (unfolded protein response) [210, 211], las cuales dan fuertes indicios de la existencia del estrés celular, también la forma fosforilada de eif2 α que participa en la desregulación de la síntesis de proteínas, como respuesta a varios factores, entre ellos el estrés del RE [212, 213]. La proteína Bap31, la cuál es una proteína integral de la membrana del RE, es fragmentada por acción de la caspasa 8, generando así un fragmento activado de 20 kDa, lo que da lugar a la liberación de calcio que posteriormente la mitocondria incorporará para su desintegración y liberación de citocromo c [214]. Actuando así como una conexión importante en la importante en la apoptosis generada por estrés en el RE, entre el retículo y la activación de la vía mitocondrial [209]. Los resultados obtenidos en este

trabajo indican una leve activación de caspas 4 y un ligero incremento en la fosfoliación de eif2 α , mientras que los otros parámetros permanecen prácticamente inalterados, lo que sugiere que el estrés de retículo endoplásmico no parece jugar un papel importante en estas células.

5.4 La activación de la vía mitocondrial, mediada por caspasa 9, se ve favorecida por la pérdida de potencial de membrana mitocondrial y el aumento de ROS

Desde hace varios años, en nuestro laboratorio se han llevado a cabo investigaciones en donde se ha concluido que la mitocondria juega un papel crucial en los mecanismos de muerte celular inducida por edelfosina y otros agentes, en tumores tanto sólidos como hematológicos, haciendo especial énfasis en que las elevadas concentraciones de ROS que la mitocondria produce, ocasionan un estrés general en la célula [163, 215-217]. La generación de ROS a través del estrés oxidativo y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial da lugar a un estrés generalizado en la célula, y la alteración de estos procesos en la mitocondria conllevan a la activación de proteínas de la familia Bcl-2, las cuales ejercen su acción sobre este organelo. Esta cadena de eventos lleva finalmente a la liberación de proteínas de tipo proapoptótico, con la posterior formación del apoptosoma que es quien finalmente activará la caspasa 9 para continuar con la ruta apoptótica [218]. Aunque solamente utilizamos una de las líneas de cáncer de hígado para estudiar en ella con más profundidad la ruta mitocondrial, la línea HepG2, por presentar rasgos de apoptosis típica, con las tres líneas en paralelo se realizaron estudios para analizar los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial, así como de producción de ROS. En las líneas de cáncer de hígado HepG2 y PLC/PRF/5, se encontró que a las 15 horas de tratamiento había una elevada pérdida del potencial de membrana mitocondrial y un ligero aumento en la concentración de ROS. Contrariamente, en la línea Huh7, desde las 15 horas observamos un elevado aumento en la cantidad de ROS producida y una ligera y casi inapreciable pérdida del potencial en la membrana mitocondrial. La detección de estas variaciones en los porcentajes indica una disfunción generalizada en la mitocondria, lo que finalmente permitirá que, mediante la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial, se liberen proteínas activadoras de la apoptosis. Resultados adicionales en otros modelos biológicos de estudio como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, sugieren un papel importante de la generación de ROS por la mitocondria en la acción citotóxica de la edelfosina, que puede provocar un daño a nivel de membrana en distintos organelos, induciendo así un

estado generalizado de daño en la célula, con la consecuente activación de la ruta apoptótica [219].

En este trabajo hemos descrito que la inhibición en la producción de ROS con agentes antioxidantes como NAC, reduce de manera significativa la apoptosis generada por edelfosina en células de cáncer de hígado, lo cual posiciona a la generación de ROS como un evento de gran importancia en la iniciación de la respuesta apoptótica inducida por edelfosina en células de cáncer hepático, lo que está en consonancia con otros estudios de acción citotóxica en procesos patológicos de hígado [218, 220].

La activación de la caspasa 9 es una de las últimas fases de la apoptosis a través de la ruta intrínseca. En este trabajo se detectó la presencia de las formas activas de la proteína caspasa 9 en la línea de cáncer de hígado HepG2. Al inhibir la activación de la caspasa 9 con su inhibidor específico z-LEDH-fmk, detectamos, mediante análisis de ciclo celular que el porcentaje de células en fase apoptótica disminuía de manera sustancial y significativa, concluyéndose que la activación de la ruta intrínseca era evidente, a la vez que dependiente de la activación de la caspasa 9.

Aunque no realizamos experimentos que nos llevaran a analizar proteínas de la familia Bcl-2, las cuales regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria, comprobamos si existía liberación de citocromo c hacia el citosol. Tal liberación fue observada a las 24 horas de tratamiento sugiriendo también que se profusiera la formación de apoptosoma, el cual finalmente activa a la caspasa 9 [142]. Realizamos el experimento de liberación de citocromo c, a tiempos quizás alevados, es muy probable que a un tiempo menor de tratamiento con edelfosina, habríamos observado ya la liberación del citocromo c.

Todos los resultados en su conjunto, parecen indicar que la inducción en células de cáncer de hígado por edelfosina está mediada por la activación de la vía intrínseca mediada por mitocondria, mientras que la implicación del retículo endoplásmico es más discutible o no tan clave como en otros tipos de células tumorales como se había descrito previamente [162, 176].

5.5 Las MAPKs participan en los mecanismos de muerte generada por edelfosina en líneas de cáncer de hepático

Las MAPKs son proteínas quinasas conocidas por participar en la regulación de la muerte y el crecimiento celular, dependiendo del contexto celular y sus variaciones en el tiempo. Las tres más importantes MAPK quinasas que han sido estudiadas son la c-Jun N-terminal proteína quinasa (JNK), p38 quinasa (p38K) y la quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK) [221]. La activación de JNK y p38K esta relacionada con las vías de señalización involucradas en la muerte

celular, así como en rutas que son conocidas por estar asociadas con patologías en el hígado[222], mientras que la activación de ERK participa en supervivencia y proliferación celular[223].

Estudios publicados por nuestro grupo, sitúan a la JNK como una de las proteínas clave involucradas en el proceso de apoptosis generado por edelfosina. Cuando JNK es estimulada por factores de estrés se fosforila, y es capaz de activar vías de señalización que afectan tanto a la mitocondria como al RE, desencadenando de esta manera las rutas de muerte en la célula tumoral [159, 170, 224]. En las líneas tumorales de cáncer de hígado se observó una activación de la JNK desde tiempo tempranos en el tratamiento con edelfosina, por lo cual es muy determinante su papel como un marcador de estrés celular, que en conjunto con otros factores como el aumento de ROS determina los vínculos que unen las señales emitidas por organelos como el RE y la mitocondria ante el estrés que sufre la célula. Apoyando la importancia que parece tener JNK en la muerte celular, se observó mediante su inhibición con el inhibidor específico SP600125 [225], preincubando antes del tratamiento con edelfosina, que la muerte celular se veía disminuida de manera importante y significativa, indicando así la importancia de la activación de la JNK en los procesos apoptóticos inducidos por el éter lípido edelfosina.

Resulta interesante razonar sobre el papel que ejerce el tiempo y la intensidad de la fosforilación de la JNK, puesto que en función de estos factores la respuesta celular puede ser distinta y contraria, de muerte o bien de proliferación celular, incluso de autofagia, como en estudios previos se ha descrito [226-229].

Mencionamos anteriormente las funciones opuestas manifestadas por distintas MAPKs, en función del estímulo y el estrés al cuál estuviese sometido la célula. Contrariamente a JNK, ERK es una proteína que participa en la regulación de procesos de supervivencia, proliferación, adhesión y progresión en el ciclo celular, entre las más importantes [223]. Aunque también se ha descrito que participa en procesos de muerte celular, relacionada con la producción de ROS intracelulares [230], y de igual manera en procesos apoptóticos [231]. En las líneas de cáncer de hígado, se observó una gran variación en el estado de activación de ERK tras el tratamiento con edelfosina. Mientras que en células HepG2 y PLC/PRF/5 se detectó una activación en ERK1/2, en las células Huh7, que poseían una activación constitutiva de ERK 1/2 que podría sugerir su participación en la proliferación de estas células tumorales, se detectaba una inhibición de la fosforilación de ERK 1/2. La inhibición bioquímica de ERK puso de manifiesto que papel ejerce la edelfosina sobre la ruta, puesto que su efecto sobre la activación de ERK parece no ser clave en su acción proapoptótica, solamente en una de las líneas tumorales, PLC/PRF/5, se observó una

disminución significativa en la muerte celular; en la línea HepG2 hubo una inhibición sin significancia y en la línea Huh7 contrariamente, se observó un aumento en el porcentaje de células apoptóticas, probablemente en este ultimo caso, la activación de ERK esté relacionada con procesos de muerte, puesto que su activación se encuentra relacionada con un elevado aumento en la concentración de ROS en la célula [230], evento que describimos ocurre en esta línea tumoral, en el apartado de la activación de la vía mitocondrial.

5.6 La acción proapoptótica de la edelfosina y la vía oncogénica PI3K/AKT/mTOR

La señalización mitogénica y antiapoptótica inapropiada es uno de los mecanismos oncogénicos más comúnmente encontrados en el carcinoma hepatocelular debido a la activación constitutiva de Akt [232-235]. En estudios llevados a cabo en distintos tipos tumorales, se ha descrito que la edelfosina inhibe la vía de señalización de PI3K/Akt, disminuyendo los niveles de fosforilación de Akt, evitando su unión a la membrana, a través de los dominios tipo “rafts” [169], y que la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por edelfosina está relacionada con su nivel de fosforilación [169].

En la línea de cáncer de hígado PLC/PRF/5, observamos una fosforilación constitutiva bastante importante en los residuos Ser473 y Thr308, la cual fue disminuyendo a partir de las 9 y 15 horas de tratamiento con edelfosina respectivamente. En la línea HepG2 la fosforilación en ambos residuos fue aumentando paulatinamente, sin embargo en el residuo Thr308 se observaron fluctuaciones importantes, puesto que pareciera que a las 9 horas bajara de manera dramática incluso podría decirse que desapareciera, y luego a las 24 horas, volvía a hacerse presente. Por último en la línea Huh7, la fosforilación en la Ser473, aparece hasta tiempos muy prolongados en el tratamiento, en este caso a las 48 horas, y por el contrario el residuo Thr308 pierde su estado fosforilado casi desde el inicio del tratamiento, puesto que a las 6 horas casi dejó de ser apreciado. Estos resultados en su conjunto apoyan los datos de sensibilidad al tratamiento con edelfosina que las líneas celulares presentan, y la relación que guarda con la fosforilación de Akt. La línea que menos sensibilidad presentó a la edelfosina, y mostró más resistencia desde el inicio de los experimentos fue la línea PLC/PRF/5, que mostró niveles elevados en la fosforilación de AKT de manera constitutiva en sus dos residuos, mientras que en las otra líneas HepG2 y Huh7 la activación de Akt en su residuo Ser473 fue aumentando de manera paulatina con el tratamiento, si bien harían falta experimentos adicionales para llegar a concluir que papel estaría tomando Akt en estos casos.

Se decidió estudiar la inhibición de la proteína Akt, debido a la importancia que ésta tiene en el desarrollo y progresión de varios tipos de tumores, llevando a cabo ensayos de inhibición con los inhibidores Akt III, VIII y X. Se ha descrito que Akt X tiene una capacidad inhibitoria sobre la fosforilación de Akt; esta inhibición se encuentra relacionada con la activación de procesos autofágicos [236], en más estudios se mostró también que su capacidad inhibitoria no impidió la actividad de PI3K y PDK1, dianas superiores en la ruta de Akt; y adicionalmente Akt X también inhibe el crecimiento celular y favorece la apoptosis [237].

En nuestros experimentos se observó que la acción inhibitoria por si misma del inhibidor específico Akt X generó apoptosis en las líneas tumorales, y también mostró potenciar el efecto proapoptótico de la edelfosina, esto estaría en concordancia con lo que los autores arriba citados describieron [237]. Si comparamos aquellas células que solamente fueron tratadas con el inhibidor Akt X con las tratadas con edelfosina, ambos tratamientos muestran porcentajes de apoptosis muy similares. Esto podría estar indicándonos que el efecto sobre la inhibición de Akt por el inhibidor Akt X es similar al de la edelfosina. Los inhibidores Akt III y Akt VIII, no mostraron un efecto apoptótico por si solos, ni interfirieron en la acción proapoptótica de la edelfosina, excepto en la línea Huh7 donde se observó un aumento en la muerte producida por la edelfosina en combinación con el inhibidor AktIII, pero no de manera significativa. Por el contrario favorecieron la disminución en la apoptosis producida por edelfosina. Parece que existen discrepancias en el funcionamiento de los inhibidores de Akt, probablemente debido a su implicación en mecanismos o rutas de señalización distintas. No obstante, el hecho de que la edelfosina induzca apoptosis en las células HepG2 sin que se observe inhibición en la fosforilación de Akt sugiere que la inhibición de esta vía de señalización no juega un papel crítico y general en la inducción de apoptosis por este éter-lípido.

5.7 Hipoxia y muerte celular

La hipoxia es un fenómeno muy comúnmente observado en tumores sólidos. Debido a daños en la función vascular se genera un suministro sanguíneo inadecuado, y en consecuencia el abastecimiento de oxígeno y nutrientes se ve obstaculizado por una malformación en vasos sanguíneos [238].

Anteriormente se mencionó a HIF-1 α como el marcador más importante de hipoxia en la célula. En procesos patológicos como el cáncer, la hipoxia intratumoral asociada con la expresión de HIF-1 α , se considera un mecanismo importante que participa en la progresión tumoral, metástasis y mortalidad de los pacientes [177]. También se ha visto que los tumores hipóxicos son resistentes a la quimio y radioterapia ya que éstos tratamientos se basan en

gran medida en la producción de radicales libres de oxígeno para inducir daño letal en DNA [239-241].

En este trabajo se decidió indagar si en cáncer de hígado podrían existir vínculos directos que relacionaran a la hipoxia con fenómenos de resistencia o sensibilidad al tratamiento por edelfosina. Para ello, primero se llevaron a cabo ensayos que nos permitieran observar la curva de expresión de HIF-1 α a lo largo del tiempo en las líneas tumorales que utilizamos, en este caso HepG2 y HeLa. Observamos en ambas líneas un patrón de expresión gradual de HIF-1 α en función del tiempo de exposición a hipoxia fisiológica, considerando una concentración constante del 1% de O₂ en el ambiente. En la línea celular HeLa se mostró una inducción en la expresión de HIF-1 α a partir de las 4 horas y se prolongó en el tiempo hasta las 24 horas de exposición, donde se observó una disminución. En la línea celular HepG2 también observamos que HIF-1 α se expresaba a las 2 horas de exposición al ambiente hipoxico, y a partir de este tiempo la proteína mostró una disminución prácticamente total en su expresión, probablemente su expresión inestable sea la causa de esa activación transitoria. Además de la hipoxia inducida por métodos ambientales, muchos compuestos como la deferoxamina y el cloruro de cobalto han sido utilizados para mimetizar y estudiar el fenotipo hipóxico [242]. Quizas por el hecho de que resulta complejo medir la hipoxia celular, ya que HIF-1 α presenta una elevada inestabilidad en el ambiente de normoxia.

Comprobamos si deferoxamina, como mimetico de la hipoxia, podía imitar el efecto de la hipoxia fisiológica en nuestras líneas celulares. Las células fueron tratadas con deferoxamina, y tras determinados intervalos de tiempo se analizaron los extractos protéicos totales. De igual manera que en el experimento de inducción de hipoxia fisiológica, observamos un incremento gradual en la expresión de HIF-1 α , sin embargo parece que esta respuesta se iniciaba a tiempos más tempranos de inducción, puesto que tras 1 hora de tratamiento determinamos que HIF-1 α había sufrido la estabilización inducida por la hipoxia para ser expresada. Gracias a la comparación de estos dos experimentos que muestran la inducción en la expresión de la proteína HIF-1 α , se realizaron los ensayos posteriores utilizando el mimético deferoxamina, ya que anticipaba la expresión de HIF-1 α .

5.8 La hipoxia no altera el efecto apoptotico de la edelfosina en célula HeLa

La hipoxia por si misma es capaz de inducir apoptosis causando un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, inhibiendo la cadena transportadora de electrones, lo cual genera la liberación de citocromo c, por

acción de las proteínas Bax y Bak debido a la disminución de ATP mitocondrial [243, 244]. También la formación de radicales libres contribuyen a la apoptosis inducida por hipoxia [245]. Y un tercer mecanismo por el cual la hipoxia es capaz de inducir apoptosis mediante la activación de JNK [246]. Sin embargo, la hipoxia también puede inhibir la respuesta apoptótica en la célula tumoral inducida por compuestos anticancerosos, como se ha visto que ocurre con varios agentes quimioterapéuticos, como en el caso de Taxol utilizado en el tratamiento del cáncer de mama [247]. Así, se quiso determinar si el efecto proapoptótico de la edelfosina en las células podría verse alterado por la hipoxia. Para ello tratamos las líneas celulares con edelfosina en condiciones de hipoxia, normoxia e hipoxia inducida con deferoxamina, y se emplearon los fármacos paclitaxel y doxorubicina como agentes control. En los resultados obtenidos en la línea celular HeLa observamos significativos porcentajes de apoptosis inducidos por edelfosina y paclitaxel en condiciones de normoxia. De forma interesante, se observó que en condiciones de O₂ al 1% (hipoxia), o tras el pretratamiento con deferoxamina, el porcentaje de células apoptóticas se mantuvo e incluso aumento para el caso de la edelfosina, mientras que disminuyó para los otros dos fármacos paclitaxel y doxorubicina. Estos resultados indican que la hipoxia no modifica la actividad proapoptótica de la edelfosina en células tumorales HeLa.

5.9 Hipoxia y resistencia a edelfosina en líneas de cáncer de hígado

Al contrario de lo detectado en células HeLa, en la línea celular HepG2 se manifestó una posible resistencia a la edelfosina inducida por hipoxia, puesto que en condiciones de oxígeno normales obtuvimos datos elevados en los porcentajes de muerte celular, sin embargo al disminuir el porcentaje de O₂, se detectó una notable disminución en el potencial inductor de apoptosis producida por edelfosina. Al igual que ha sido descrito por otros investigadores las células pueden volverse resistentes a la apoptosis durante periodos de hipoxia, se ha visto que células que son tratadas con inductores de apoptosis potentes como estaurosporina fueron menos sensibles en condiciones de hipoxia que en estado de oxigenación normal [248]. No obstante el propio inductor de hipoxia deferoxamina por si mismo mostró también capacidad de inducir apoptosis en las células HepG2, por lo que probablemente el aumento en la población de células en apoptosis al combinarlo con la edelfosina no fué debido propiamente por la acción de la edelfosina, sino por el daño previo que las células ya presentaban. Resultaría interesante estudiar los procesos mediante los cuales la célula genera resistencia al tratamiento, podría continuarse investigando si existe activación de proteínas proapoptóticas que generen la liberación de citocromo c y posteriormente se active la ruta de

apoptosis intrínseca, o bien que la edelfosina esté impidiendo la translocación de esas proteínas a la membrana mitocondrial, y por consecuencia la liberación de citocromo *c* no se lleve a cabo y por consecuencia la progresión de la ruta intrínseca no pueda llevarse a cabo.

Los resultados opuestos obtenidos al estudiar el efecto de la hipoxia en la inducción de apoptosis por edelfosina dependiendo del tipo celular, HeLa o HepG2, indica que la hipoxia afecta de forma dependiente del tipo celular a la acción proapoptótica de la edelfosina, y podría sugerirse que otros tipos de respuesta promovidos por el éter-lípido pudieran desencadenarse o no dependiendo de la concentración de oxígeno necesaria para la puesta en marcha de distintos procesos bioquímicos en cada tipo celular.

5.10 Células stem cancerosas

Recordando que el cáncer hepático está considerado como uno de los más recurrentes y representa una importante causa de muerte a nivel mundial, surge la necesidad de buscar nuevos tratamientos que se dirijan hacia dianas específicas, y hacia las rutas de señalización que han sido estudiadas en estas patologías. En respuesta a esa necesidad, han surgido estudios que indican que los tumores están mantenidos por una población especial de células cancerígenas, las células stem cancerosas. La teoría de las células stem cancerígenas (CSC) propone que estas células son las únicas, de entre todas las que componen la masa tumoral, que pueden autorenovarse, manteniendo así el tumor. Estas células madre cancerígenas tienen características de células madre, y no presentan sensibilidad a las terapias comunes, sino que tienen la capacidad de sobrevivir y continuar dividiéndose, y en consecuencia el tumor aparecería nuevamente con el paso del tiempo [249, 250]. Nuestro trabajo se fundamenta en el inicio del estudio del cáncer hepático desde una perspectiva molecular y celular para conocer su capacidad y vulnerabilidad a sufrir muerte celular, utilizando a la edelfosina como una herramienta prometedora de terapia alternativa ante esta patología.

5.11 La línea celular PLC/PRF/5 contiene un porcentaje elevado de SP (side population) y es capaz de formar hepatoesferas

Utilizando una de las líneas de cáncer de hígado que presentaba más resistencia al tratamiento por edelfosina, generamos un modelo de experimentación en 3 dimensiones (3D) para realizar ensayos dirigidos al estudio de la sensibilidad por parte de las células stem cancerígenas a la edelfosina. Un modelo esferoide en 3D es el resultado de la agregación de células que presentan la estructura de mayor similitud a un órgano y de menor superficie [251, 252]. Este acoplamiento

de células imita un proceso natural de embriogénesis, morfogénesis y organogénesis *in vitro* [253].

Están descritos una serie de marcadores específicos de células stem cancerosas en cáncer hepático, los cuáles al expresarse ponen de manifiesto la enfermedad a nivel clínico [254]. Ayudándonos de estos marcadores, de manera preliminar hicimos un screenig para determinar los porcentajes de cada marcador que contenía la línea celular PLC/PRF/5. Se observó que se encontraban expresados marcadores como CD133 [255, 256], CD90 [257], EpCAM [258], CD24 [259], CD34, CD44 [260] en altos porcentajes. Casi el 78% de células expresaba el marcador CD133+, lo que nos indicaba que más marcadores debían ser utilizados para conseguir discriminar la población stem, debido a que la población de CSC constituye una pequeña fracción de células en tumores y líneas celulares [256]. Mediante la técnica de sorting separamos una subpoblación de células que expresaran la combinación de marcadores CD90 /CD34/EpCAM (triples positivas), correspondientes al 0,7% de la población y las crecimos en una superficie no adherente para generar su enriquecimiento. De ésta manera se obtuvo la denominada SP (del inglés Side Population) [256], que es muy similar al porcentaje obtenido por otros autores [181].

5.12 La edelfosina inhibe el potencial clonogénico *in vitro* de la SP en agar

El ensayo de clonogenicidad o ensayo de formación de colonias, es utilizado para evaluar efectos de radiación, quimioterapia, desarrollo y tamizaje de drogas entre otros, existen varias técnicas experimentales para llevar a cabo este tipo de ensayos utilizando distintas condiciones (crecimiento sobre agar blando, superficies sólidas como placas de cultivo, o en matrices semisolidas de agarosa). Estudiamos la capacidad clonogénica de la SP de la línea celular PLC/PRF/5 que ya había sido capaz de formar esferas. Para ello evaluamos si una célula era capaz de dividirse y formar una colonia, luego de haber sido expuesta a un tratamiento [259], en nuestro caso utilizando edelfosina. Al observar cada día el crecimiento paulatino de las células, notamos claramente que el crecimiento variaba en función de la concentración de edelfosina utilizada. Experimentamos con un amplio rango de concentraciones de edelfosina, lo que nos permitió observar una curva de inhibición que puso de manifiesto su capacidad de inhibición sobre el crecimiento de la SP. Ya que desde concentraciones tan bajas como 1 nM se registró una disminución en el número de colonias comparado con los controles de cultivo en agar que no contenían edelfosina.

5.13 La edelfosina induce muerte por apoptosis en la SP

Se sabe que las células de cáncer hepático muestran una elevada resistencia a la quimioterapia tradicional. Y es aún mas elevada la resistencia que se ha visto en poblaciones de CSC o progenitoras [261]. En el desarrollo de este trabajo hemos estudiado las rutas de muerte, vías de señalización y en general los procesos en los cuales la edelfosina pudiera tener algún efecto en la viabilidad celular. Los resultados aquí descritos sugieren que, en general, la edelfosina es un fármaco con capacidad inductora de procesos de muerte celular en células de cáncer de hígado. Se quiso saber si era posible que ejerciera un efecto directo sobre la SP induciendo algún tipo de daño, más específicamente de muerte celular. Para tal fin se llevaron a cabo ensayos basados en la identificación de procesos apoptóticos, y ayudándonos de técnicas de citometría de flujo identificamos que la edelfosina indujo apoptosis en las hepatoesferas (SP) de la línea celular PLC/PRF/5. La Anexina V es un compuesto que presenta afinidad por la PS (fosfatidilserina), que durante procesos de apoptosis se transloca a la membrana externa de la célula, determinando de esta manera las poblaciones que presentan muerte apoptótica. Los ensayos de Anexina V mostraron que el porcentaje de células en fase de apoptosis tratadas con edelfosina era mayor respecto a aquellas esferas sin tratar. Observamos aumentos desde un 34% hasta un 52% de muerte por apoptosis en concentraciones de 10 μ M de edelfosina, porcentajes que aumentaron de manera dosis-dependiente, confirmando finalmente que la edelfosina presenta propiedades proapoptóticas sobre la SP. En otros estudios se han llevado a cabo ensayos de screening exhaustivos en donde han encontrado que diversos compuestos también inducen procesos apoptóticos en SP de diversos tipos tumorales [262]. Aunque los análisis de muerte celular no fueron continuados más allá de los que únicamente describimos, estos resultados constituyen la base para estudios posteriores de caracterización de las rutas de señalización implicadas en la muerte celular producida por edelfosina en CSC hepáticas.

5.14 Identificación de genes regulados diferencialmente en la SP de la línea celular PLC/PRF/5

En los resultados de análisis de expresión génica llevados a cabo, se identificó una gran cantidad de genes regulados en su expresión de manera diferencial en la población SP aislada de la línea celular PLC/PRF/5. Se llevó a cabo una búsqueda en bases de datos de aquellos genes implicados en procesos que han sido descritos por otros grupos y que son clave en la biología del cáncer hepático [263]. Encontramos que genes con funciones transportadoras [183, 184] se hallaban en la lista de genes regulados de manera positiva. Esto resulta ser congruente con las investigaciones que concluyen que las CSC tienen capacidad

de expulsar fármacos a través de numerosos transportadores de membrana, que es la cualidad más importante en las CSC para resistir a las terapias. También se ha visto que existen mecanismos de resistencia a fármacos independiente de transportadores como aquellos regulados por AREG asociado con resistencia a gefitinib [182], que es uno de los genes también encontrado en nuestra lista de genes regulados de manera positiva. De acuerdo al análisis del microarray, el gen que presentó el nivel de regulación positiva más elevado fue CFH (R. fold = 33,72428756). El factor H del complemento (CFH) regula las vías alternas de la activación del complemento [264]. Un polimorfismo de CFH tiene una fuerte asociación con la degeneración macular relacionada con la edad. La mutación de CFH y la desregulación resultante del sistema del complemento también está relacionada con el síndrome urémico hemolítico atípico [265]. Aunque el papel de CFH en el cáncer no está bien entendido, la sobreexpresión de CFH está relacionada con una reducción de la metástasis y/o riesgo de mortalidad en sarcomas de tejidos blandos [266]. Su relación con cáncer hepático no ha sido determinada.

Capítulo 6. CONCLUSIONES

1. La edelfosina presenta actividad citotóxica frente a varias líneas celulares de cáncer de hígado, induciendo muerte celular a través de la participación de diversas rutas de muerte celular, incluyendo apoptosis y necrosis, dependiendo del tipo celular. El efecto citotóxico de edelfosina en distintas líneas celulares de cáncer de hígado se manifiesta a través de la inducción de distintas vías de señalización de muerte dependientes del tipo celular.
2. La activación persistente de JNK, pero no la vía de señalización de ERK, parece jugar un papel importante en la inducción de muerte celular por edelfosina en células de cáncer de hígado.
3. La vía intrínseca mitocondrial y la generación de ROS constituyen dos procesos claves en la inducción de muerte por edelfosina en células de cáncer de hígado, mientras que el estrés de retículo endoplásmico no parece jugar un papel importante en este proceso.
4. La inhibición de Akt no parece ejercer un papel crítico en inducción de apoptosis por edelfosina en células de cáncer de hígado.
5. El que se afecte o no la acción proapoptótica de la edelfosina por estados de hipoxia depende del tipo celular estudiado.
6. La importancia en la recurrencia del cáncer hepático ha llevado a la búsqueda de nuevas dianas específicas para su tratamiento. El éter-lípido edelfosina mediante su acción citotóxica en células stem es capaz de inhibir su potencial de autorrenovación, inhibiendo la formación de hepatoesferas, y a su vez induce muerte celular en las células stem cancerosas de hígado, induciendo apoptosis al ser tratadas con edelfosina.

Capítulo 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Haber D Fau - Harlow, E. and E. Harlow, *Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age*. Nat Genet, 1997. **16**(4): p. 320-2.
2. Hunter, T., *Oncoprotein networks*. Cell, 1997. **88**(3): p. 333-46.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
4. Feinberg, A.P. and B. Tycko, *The history of cancer epigenetics*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 143-53.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
6. Wallace, M.C., et al., *The evolving epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global perspective*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2015. **9**(6): p. 765-79.
7. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
8. Medica, S.E.d.O., *Las cifras del cáncer en España 2014*. 2014.
9. Mann, C.D., et al., *Prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma: a systematic review*. Eur J Cancer, 2007. **43**(6): p. 979-92.
10. Gomaa, A.I. and I. Waked, *Recent advances in multidisciplinary management of hepatocellular carcinoma*. World J Hepatol, 2015. **7**(4): p. 673-87.
11. Bray, F., et al., *Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008*. Int J Cancer, 2013. **132**(5): p. 1133-45.
12. Altekruse, S.F., et al., *SEER cancer registry biospecimen research: yesterday and tomorrow. Changing hepatocellular carcinoma incidence and liver cancer mortality rates in the United States*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014. **23**(12): p. 2681-7.
13. Altekruse, S.F., et al., *Changing hepatocellular carcinoma incidence and liver cancer mortality rates in the United States*. Am J Gastroenterol, 2014. **109**(4): p. 542-53.
14. Bosch, F.X., et al., *Primary liver cancer: worldwide incidence and trends*. Gastroenterology, 2004 **127**(5 Suppl 1): p. S5-S16.
15. El-Serag, H.B., *Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2012. **142**(6): p. 1264-1273.
16. Yang, J.D. and L.R. Roberts, *Hepatocellular carcinoma: A global view*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010. **7**(8): p. 448-58.

17. Perz, J.F., et al., *The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide*. J Hepatol, 2006. **45**(4): p. 529-38.
18. Fattovich, G., F. Bortolotti F Fau - Donato, and F. Donato, *Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors*. J Hepatol, 2008 **48**(2): p. 335-52.
19. Ross Rk Fau - Yu, M.C., et al., *Aflatoxin biomarkers*. Lancet, 1992. **340**(8811): p. 119.
20. Liu, Y. and F. Wu, *Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment*. Environ Health Perspect, 2010. **118**(6): p. 818-24.
21. Mancebo, A., et al., *Annual incidence of hepatocellular carcinoma among patients with alcoholic cirrhosis and identification of risk groups*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2013 **11**(1): p. 95-101.
22. Lin, C.W., et al., *Heavy alcohol consumption increases the incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-related cirrhosis*. J Hepatol, 2013. **58**(4): p. 730-5.
23. M., G.B., *Oncología Clínica*. Vol. 2. 2010, España: Momento Médico Iberoamericana.
24. Laurent-Puig, P. and J. Zucman-Rossi, *Genetics of hepatocellular tumors*. Oncogene, 2006. **25**(27): p. 3778-86.
25. Furuya, K., et al., *Macroregenerative nodule of the liver. A clinicopathologic study of 345 autopsy cases of chronic liver disease*. Cancer, 1988. **61**(1): p. 99-105.
26. Terada, T., K. Ueda, and Y. Nakanuma, *Histopathological and morphometric analysis of atypical adenomatous hyperplasia of human cirrhotic livers*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1993. **422**(5): p. 381-8.
27. Edmondson, H.A., B. Henderson, and B. Benton, *Liver-cell adenomas associated with use of oral contraceptives*. N Engl J Med, 1976. **294**(9): p. 470-2.
28. Cervello, M., et al., *Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: novel agents on the horizon*. Oncotarget, 2012. **3**(3): p. 236-60.
29. Marquardt, J.U., J.B. Andersen, and S.S. Thorgeirsson, *Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer*. Nat Rev Cancer, 2015 **15**(11): p. 653-67.
30. Marquardt Ju Fau - Seo, D., et al., *Sequential transcriptome analysis of human liver cancer indicates late stage acquisition of malignant traits*. J Hepatol, 2014. **60**(2): p. 346-53.

31. Schulze, K., et al., *Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets*. Nat Genet, 2015. **47**(5): p. 505-11.
32. Jiang, J.H., et al., *Clinical significance of the ubiquitin ligase UBE3C in hepatocellular carcinoma revealed by exome sequencing*. Hepatology, 2014. **59**(6): p. 2216-27.
33. Kaposi-Novak, P., et al., *Central role of c-Myc during malignant conversion in human hepatocarcinogenesis*. Cancer Res, 2009 **69**(7): p. 2775-82.
34. Holczbauer, A., et al., *Modeling pathogenesis of primary liver cancer in lineage-specific mouse cell types*. Gastroenterology, 2013. **145**(1): p. 221-31.
35. Nault, J.C., et al., *Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis*. Hepatology, 2014 **60**(6): p. 1983-92.
36. Tovar, V., et al., *IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage*. J Hepatol, 2010. **52**(4).
37. Woo, H.G., et al., *Profiling of exome mutations associated with progression of HBV-related hepatocellular carcinoma*. PLoS One, 2014 **9**(12): p. e115152.
38. Totoki, Y., et al., *Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes*. Nat Genet, 2014. **46**(12): p. 1267-73.
39. Zhong, R., et al., *Genetic variant in SWI/SNF complexes influences hepatocellular carcinoma risk: a new clue for the contribution of chromatin remodeling in carcinogenesis*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 4147.
40. Guichard, C., et al., *Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma*. Nat Genet, 2012. **44**(6): p. 694-8.
41. Li, M., et al., *Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma*. Nat Genet, 2011. **43**(9): p. 828-9.
42. Fujimoto, A., et al., *Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators*. Nat Genet, 2012. **44**(7): p. 760-4.
43. Huang, J., et al., *Exome sequencing of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma*. Nat Genet, 2012 **44**(10): p. 1117-21.

44. Malkin, D., et al., *Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms*. Science, 1990 **250**(4985): p. 1233-8.
45. Bressac, B., et al., *Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa*. Nature, 1991 **350**(6713): p. 429-31.
46. Hsu, I.C., et al., *Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas*. Nature, 1991. **350**(6317): p. 427-8.
47. Vautier, G., et al., *p53 mutations in british patients with hepatocellular carcinoma: clustering in genetic hemochromatosis*. Gastroenterology, 1999 **117**(1): p. 154-60.
48. Morin, P.J., et al., *Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC*. Science, 1997 **275**(5307): p. 1787-90.
49. Koch, A., et al., *Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene*. Cancer Res, 1999 **59**(2): p. 269-73.
50. Wei, Y., et al., *Activation of beta-catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas*. Oncogene, 2000. **19**(4): p. 498-504.
51. Chen, Y.W., et al., *P53 gene and Wnt signaling in benign neoplasms: beta-catenin mutations in hepatic adenoma but not in focal nodular hyperplasia*. Hepatology, 2002. **36**(4 Pt 1): p. 927-35.
52. Laurent-Puig, P., et al., *Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis*. Gastroenterology, 2001. **120**(7): p. 1763-73.
53. Hickman, E.S., K. Moroni Mc Fau - Helin, and K. Helin, *The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(1): p. 60-6.
54. Jin, M., et al., *p16 is a major inactivation target in hepatocellular carcinoma*. Cancer, 2000. **89**(1): p. 60-8.
55. Aoki, H., et al., *Molecular cloning of a rat chromosome putative recombinogenic sequence homologous to the hepatitis B virus encapsidation signal*. Proc Natl Acad Sci U S A. , 1996 **93**(14): p. 7300-4.
56. Dejean A Fau - Bougueleret, L., et al., *Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma*. Nature, 1986. **322**(6074): p. 70-2.

57. Wang, J., et al., *Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma*. Nature, 1990. **343**(6258): p. 555-7.
58. Graef, E., et al., *Insertional activation of mevalonate kinase by hepatitis B virus DNA in a human hepatoma cell line*. Oncogene, 1994. **9**(1): p. 81-7.
59. Ferber, M.J., et al., *Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers*. (0950-9232 (Print)).
60. Horikawa, I. and J.C. Barrett, *Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms*. Carcinogenesis, 2003 **24**(7): p. 1167-76.
61. Paterlini-Brechot, P., et al., *Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene*. **Oncogene**, 2003. **22**(25): p. 3911-6.
62. Andrisani, O.M. and S. Barnabas, *The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review)*. Int J Oncol, 1999. **15**(2): p. 373-9.
63. Diao, J., et al., *X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway*. J Biol Chem, 2001 **276**(11): p. 8328-40.
64. Cagatay, T. and M. Ozturk, *P53 mutation as a source of aberrant beta-catenin accumulation in cancer cells*. Oncogene, 2002. **21**(52): p. 7971-80.
65. Yamashita, T. and X.W. Wang, *Cancer stem cells in the development of liver cancer*. J Clin Invest, 2013. **123**(5): p. 1911-8.
66. Duncan, A.W., C. Dorrell, and M. Grompe, *Stem cells and liver regeneration*. Gastroenterology, 2009. **137**(2): p. 466-81.
67. Overturf, K., et al., *Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes*. Am J Pathol, 1997. **151**(5): p. 1273-80.
68. Fausto, N. and J.S. Campbell, *Mouse models of hepatocellular carcinoma*. Semin Liver Dis, 2010. **30**(1): p. 87-98.
69. Yimlamai, D., et al., *Hippo pathway activity influences liver cell fate*. Cell, 2014. **157**(6): p. 1324-38.
70. Fitamant, J., et al., *YAP Inhibition Restores Hepatocyte Differentiation in Advanced HCC, Leading to Tumor Regression*. Cell Rep, 2015.
71. Tschaharganeh, D.F., et al., *Yes-associated protein up-regulates Jagged-1 and activates the Notch pathway in human*

- hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2013. **144**(7): p. 1530-1542.e12.
72. Lemaigre, F.P., *Hepatocytes as a source of cholangiocytes in injured liver*. Hepatology, 2014. **59**(2): p. 726-8.
73. Malato, Y., et al., *Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration*. J Clin Invest, 2011. **121**(12): p. 4850-60.
74. Yanger, K., et al., *Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration*. Genes Dev, 2013. **27**(7): p. 719-24.
75. Tarlow, B.D., et al., *Bipotent adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes*. Cell Stem Cell, 2014. **15**(5): p. 605-18.
76. Farber, E., *Carcinoma of the liver in rats fed ethionine*. AMA Arch Pathol, 1956. **62**(6): p. 445-53.
77. Opie, E.L., *THE PATHOGENESIS OF TUMORS OF THE LIVER PRODUCED BY BUTTER YELLOW*. J Exp Med, 1944. **80**(3): p. 231-46.
78. Watson, M.E., et al., *Glycosylation-related Diagnostic and Therapeutic Drug Target Markers in Hepatocellular Carcinoma*. J Gastrointestin Liver Dis, 2015. **24**(3): p. 349-57.
79. Flores, A. and J.A. Marrero, *Emerging trends in hepatocellular carcinoma: focus on diagnosis and therapeutics*. Clin Med Insights Oncol, 2014 **8**: p. 71-6.
80. Ono, M. and S. Hakomori, *Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness*. Glycoconj J, 2004. **20**(1): p. 71-8.
81. Blomme, B., et al., *Alteration of protein glycosylation in liver diseases*. J Hepatol, 2009. **50**(3): p. 592-603.
82. Marsh, J.W., et al., *Is the pathologic TNM staging system for patients with hepatoma predictive of outcome?* Cancer, 2000. **88**(3): p. 538-43.
83. Okuda K Fau - Ohtsuki, T., et al., *Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients*. Cancer, 1985 **56**(4): p. 918-28.
84. Duseja, A., *Staging of hepatocellular carcinoma*. J Clin Exp Hepatol. , 2014 **4**(Suppl 3): p. S74-9.
85. Llovet Jm Fau - Bruix, J. and J. Bruix, *Prospective validation of the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2000. **32**(3): p. 679-80.

86. Llovet, J.M., J. Bru C Fau - Bruix, and J. Bruix, *Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification*. Semin Liver Dis, 1999. **19**(3): p. 329-38.
87. Lee, K.K., et al., *Liver transplantation versus liver resection for the treatment of hepatocellular carcinoma*. J Surg Oncol, 2010. **101**(1): p. 47-53.
88. Kinoshita H Fau - Sakai, K., et al., *Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma*. World J Surg, 1986. **10**(5): p. 803-8.
89. Li, N., et al., *Surgical and oncologic outcomes following laparoscopic versus open liver resection for hepatocellular carcinoma: A meta-analysis*. Hepatol Res., 2012 **42**(1): p. 51-9.
90. Livraghi T Fau - Festi, D., et al., *US-guided percutaneous alcohol injection of small hepatic and abdominal tumors*. Radiology, 1986 **161**(2): p. 309-12.
91. Rossi, S., et al., *Percutaneous RF interstitial thermal ablation in the treatment of hepatic cancer*. AJR Am J Roentgenol 1996. **167**(3): p. 759-68.
92. Seki, T., et al., *Ultrasonically guided percutaneous microwave coagulation therapy for small hepatocellular carcinoma*. Cancer, 1994 **74**(3): p. 817-25.
93. Pacella, C.M., et al., *Laser thermal ablation in the treatment of small hepatocellular carcinoma: results in 74 patients*. Radiology, 2001 **221**(3): p. 712-20.
94. Ross, W.B., et al., *Cryotherapy of liver tumours--a practical guide*. HPB Surg, 1995 **8**(3): p. 167-73.
95. Lencioni, R., *Loco-regional treatment of hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2010. **52**(2): p. 762-73.
96. Kuang, M., et al., *Ethanol ablation of hepatocellular carcinoma Up to 5.0 cm by using a multipronged injection needle with high-dose strategy*. Radiology, 2009. **253**(2): p. 552-61.
97. Orlacchio, A., et al., *Percutaneous cryoablation of small hepatocellular carcinoma with US guidance and CT monitoring: initial experience*. Cardiovasc Intervent Radiol, 2008 **31**(3): p. 587-94.
98. Lo, C.M., et al., *Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2002 **35**(5): p. 1164-71.
99. Tsochatzis, E.A., A.K. Germani G Fau - Burroughs, and A.K. Burroughs, *Transarterial chemoembolization, transarterial chemotherapy, and intra-arterial chemotherapy for*

- hepatocellular carcinoma treatment*. Semin Oncol, 2010 **37**(2): p. 89-93.
100. Mazzaferro, V., et al., *Milan criteria in liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an evidence-based analysis of 15 years of experience*. Liver Transpl, 2011 **17** (Suppl 2): p. S44-57.
101. *EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2012 **56**(4): p. 908-43.
102. Lai, C.L., et al., *Doxorubicin versus no antitumor therapy in inoperable hepatocellular carcinoma. A prospective randomized trial*. Cancer. , 1988 **62**(3): p. 479-83.
103. Fuchs, C.S., et al., *A phase II trial of gemcitabine in patients with advanced hepatocellular carcinoma*. Cancer, 2002 **94**(12): p. 3186-91.
104. Yeo, W., et al., *A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma*. J Natl Cancer Inst. , 2005 **97**(20): p. 1532-8.
105. Chang, Y.S., et al., *Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models*. Cancer Chemother Pharmacol, 2007. **59**(5): p. 561-74.
106. Nojiri, K., et al., *Sorafenib and TRAIL have synergistic effect on hepatocellular carcinoma*. Int J Oncol, 2013. **42**(1): p. 101-8.
107. Zhu, A.X., et al., *Effect of everolimus on survival in advanced hepatocellular carcinoma after failure of sorafenib: the EVOLVE-1 randomized clinical trial*. JAMA. , 2014 **312**(1): p. 57-67.
108. O'Reilly, K.E., et al., *mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt*. Cancer Res, 2006 **66**(3): p. 1500-8.
109. Yang, M.H., et al., *Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(3): p. 295-305.
110. Semenza, G.L., *Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents*. Drug Discov Today, 2007. **12**(19-20): p. 853-9.
111. Mohyeldin, A., T. Garzon-Muvdi, and A. Quinones-Hinojosa, *Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche*. Cell Stem Cell. **7**(2): p. 150-61.
112. Pouyssegur, J., F. Dayan, and N.M. Mazure, *Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 437-43.
113. Harada, H., et al., *Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance*. Oncogene, 2007. **26**(54): p. 7508-16.

114. Sendoel, A., et al., *HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase*. *Nature*. **465**(7298): p. 577-83.
115. Denko, N.C., *Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour*. *Nat Rev Cancer*, 2008.
116. Maynard, M.A. and M. Ohh, *The role of hypoxia-inducible factors in cancer*. *Cell Mol Life Sci*, 2007. **64**(16): p. 2170-80.
117. Shukla, S., C.P. Wu, and S.V. Ambudkar, *Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008. **4**(2): p. 205-23.
118. Fojo, A.T. and M. Menefee, *Microtubule targeting agents: basic mechanisms of multidrug resistance (MDR)*. *Semin Oncol*, 2005. **32**(6 Suppl 7): p. S3-8.
119. Gatti, L. and F. Zunino, *Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms*. *Methods Mol Med*, 2005. **111**: p. 127-48.
120. Gottesman, M.M., T. Fojo, and S.E. Bates, *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(1): p. 48-58.
121. Tredan, O., et al., *Drug resistance and the solid tumor microenvironment*. *J Natl Cancer Inst*, 2007. **99**(19): p. 1441-54.
122. Mellor, H.R. and R. Callaghan, *Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response*. *Pharmacology*, 2008. **81**(4): p. 275-300.
123. Roizin-Towle, L. and E.J. Hall, *Studies with bleomycin and misonidazole on aerated and hypoxic cells*. *Br J Cancer*, 1978. **37**(2): p. 254-60.
124. Gray, L.H., et al., *The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy*. *Br J Radiol*, 1953. **26**(312): p. 638-48.
125. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway*. *Sci STKE*, 2007. **2007**(407): p. cm8.
126. Talks, K.L., et al., *The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages*. *Am J Pathol*, 2000. **157**(2): p. 411-21.
127. Zhong, H., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases*. *Cancer Res*, 1999. **59**(22): p. 5830-5.
128. Bertout, J.A., S.A. Patel, and M.C. Simon, *The impact of O2 availability on human cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(12): p. 967-75.

129. Semenza, G.L., *Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics*. Oncogene, 2010. **29**(5): p. 625-34.
130. Rohwer, N. and T. Cramer, *Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways*. Drug Resist Updat, 2011. **14**(3): p. 191-201.
131. Imamura, T., et al., *HIF-1alpha and HIF-2alpha have divergent roles in colon cancer*. Int J Cancer, 2009. **124**(4): p. 763-71.
132. Raval, R.R., et al., *Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(13): p. 5675-86.
133. Nardinocchi, L., et al., *Inhibition of HIF-1alpha activity by homeodomain-interacting protein kinase-2 correlates with sensitization of chemoresistant cells to undergo apoptosis*. Mol Cancer, 2009. **8**: p. 1.
134. Degterev, A. and J. Yuan, *Expansion and evolution of cell death programmes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(5): p. 378-90.
135. Schweichel Ju Fau - Merker, H.J. and H.J. Merker, *The morphology of various types of cell death in prenatal tissues*. Teratology, 1973 **7**(3): p. 253-66.
136. Baehrecke, E.H., *How death shapes life during development*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002 **3**(10): p. 779-87.
137. Kerr Jf Fau - Wyllie, A.H., A.R. Wyllie Ah Fau - Currie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer 1972 **26**(4): p. 239-57.
138. Clarke, P.G., *Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms*. Anat Embryol (Berl), 1990. **181**(3): p. 195-213.
139. Nicholson, D.W., *Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death*. Cell Death Differ, 1999. **6**(11): p. 1028-42.
140. Kroemer, G. and J.C. Reed, *Mitochondrial control of cell death*. Nat Med, 2000 **6**(5): p. 513-9.
141. Bursch, W., *The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death*. Cell Death Differ. , 2001 **8**(6): p. 569-81.
142. Ferri, K.F. and G. Kroemer, *Organelle-specific initiation of cell death pathways*. Nat Cell Biol. , 2001. **3**(11): p. 255-63.
143. Orrenius, S., *Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death*. Drug Metab Rev 2007. **39**(2-3): p. 443-55.

144. Sayers, T.J., *Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy*. Cancer Immunol Immunother. , 2011 **60**(8): p. 1173-80.
145. Ouyang, L., et al., *Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis*. Cell Prolif, 2012 **45**(6): p. 487-98.
146. Yu, L., et al., *Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006 **103**(13): p. 4952-7.
147. Mathew, R., V. Karantza-Wadsworth, and E. White, *Role of autophagy in cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(12): p. 961-7.
148. Uchiyama, Y., et al., *Autophagy-physiology and pathophysiology*. Histochem Cell Biol, 2008. **129**(4): p. 407-20.
149. Baehrecke, E.H., *How death shapes life during development*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(10): p. 779-87.
150. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. Cell Death Differ, 2012. **19**(1): p. 107-20.
151. Holler, N., et al., *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 489-95.
152. Lin, Y., et al., *Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10822-8.
153. Goossens, V., et al., *Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8115-9.
154. Gajate, C. and F. Mollinedo, *Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH(3) (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells*. Curr Drug Metab. Oct;;, 2002 **3**(5): p. 491-525.
155. Croft, S.L., D. Snowdon, and V. Yardley, *The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against Leishmania donovani, Trypanosoma cruzi and Trypanosoma brucei*. J Antimicrob Chemother, 1996. **38**(6): p. 1041-7.
156. Varela, M.R., et al., *In vitro and in vivo efficacy of ether lipid edelfosine against Leishmania spp. and SbV-resistant parasites*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(4): p. e1612.

157. Smorenburg, C.H., et al., *Phase II study of miltefosine 6% solution as topical treatment of skin metastases in breast cancer patients*. Anticancer Drugs, 2000. **11**(10): p. 825-8.
158. van Blitterswijk, W.J., H. Hilkmann, and G.A. Storme, *Accumulation of an alkyl lysophospholipid in tumor cell membranes affects membrane fluidity and tumor cell invasion*. Lipids, 1987. **22**(11): p. 820-3.
159. Nieto-Miguel, T., et al., *Endoplasmic reticulum stress in the proapoptotic action of edelfosine in solid tumor cells*. Cancer Res 2007 **67**(21): p. 10368-78.
160. Nieto-Miguel, T., F. Gajate C Fau - Mollinedo, and F. Mollinedo, *Differential targets and subcellular localization of antitumor alkyl-lysophospholipid in leukemic versus solid tumor cells*. J Biol Chem. , 2006. **281**(21): p. 14833-40.
161. van Blitterswijk, W.J. and M. Verheij, *Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(3): p. 663-74.
162. Gajate, C., et al., *Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum*. Oncogene, 2012. **31**(21): p. 2627-39.
163. Gajate, C. and F. Mollinedo, *Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts*. Blood. , 2007. **109**(2): p. 711-9.
164. Helfman, D.M., et al., *Phospholipid-sensitive Ca²⁺-dependent protein phosphorylation system in various types of leukemic cells from human patients and in human leukemic cell lines HL60 and K562, and its inhibition by alkyl-lysophospholipid*. Cancer Res, 1983. **43**(6): p. 2955-61.
165. Powis, G., et al., *Selective inhibition of phosphatidylinositol phospholipase C by cytotoxic ether lipid analogues*. Cancer Res, 1992. **52**(10): p. 2835-40.
166. Seewald, M.J., et al., *Inhibition of growth factor-dependent inositol phosphate Ca²⁺ signaling by antitumor ether lipid analogues*. Cancer Res, 1990. **50**(15): p. 4458-63.
167. Dineva, I.K., et al., *Erufosine suppresses breast cancer in vitro and in vivo for its activity on PI3K, c-Raf and Akt proteins*. J Cancer Res Clin Oncol, 2012. **138**(11): p. 1909-17.
168. Ruiter, G.A., et al., *Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway*. Anticancer Drugs, 2003. **14**(2): p. 167-73.

169. Reis-Sobreiro, M., et al., *Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma*. Blood Cancer J. May 31, 2013 **3**: p. e118.
170. Gajate, C., et al., *Involvement of c-Jun NH2-terminal kinase activation and c-Jun in the induction of apoptosis by the ether phospholipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine*. Mol Pharmacol. , 1998. **53**(4): p. 602-12.
171. Gajate, C. and F. Mollinedo, *The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells*. Blood, 2001 **98**(13): p. 3860-3.
172. Gajate, C., et al., *Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis*. J Exp Med, 2004. **200**(3): p. 353-65.
173. Gajate, C., et al., *Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis*. Int J Cancer. , 2000. **85** (5): p. 674-82.
174. Estella-Hermoso de Mendoza, A., et al., *Antitumor alkyl ether lipid edelfosine: tissue distribution and pharmacokinetic behavior in healthy and tumor-bearing immunosuppressed mice*. Clin Cancer Res, 2009 **15**(3): p. 858-64.
175. Mollinedo, F., et al., *Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma*. Oncogene. , 2010. **29**(26): p. 3748-57.
176. Bonilla, X., et al., *Endoplasmic reticulum targeting in Ewing's sarcoma by the alkylphospholipid analog edelfosine*. Oncotarget, 2015. **6**(16): p. 14596-613.
177. Yang, M.H. and K.J. Wu, *TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development*. Cell Cycle. , 2008. **7**(14): p. 2090-6. .
178. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
179. Semenza, G.L., et al., *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem., 1996. **271**(51): p. 32529-37.
180. Maxwell, P.H., *The HIF pathway in cancer*. Semin Cell Dev Biol. , 2005 **16**(4-5): p. 523-30.
181. Chiba, T., et al., *Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties*. Hepatology, 2006. **44**(1): p. 240-51.

182. Kakiuchi, S., et al., *Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839)*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(24)(0964-6906 (Print)): p. 3029-43.
183. Wulf, G.G., et al., *A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia*. Blood, 2001 **98**(4): p. 1166-73.
184. Hirschmann-Jax, C., et al., *A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2004. **101**(39): p. 14228-33.
185. Hu, L., et al., *Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis*. Oncogene, 2004. **23**(1): p. 298-302.
186. Tabas-Madrid, D., A. Nogales-Cadenas R Fau - Pascual-Montano, and A. Pascual-Montano, *GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics*. Nucleic Acids Res, 2012 **40**: p. W478-83.
187. Nogales-Cadenas, R., et al., *GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information*. Nucleic Acids Res., 2009. **37**: p. W317-22.
188. Carmona-Saez, P., et al., *GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists*. Genome Biol. , 2007. **8**(1).
189. Irizarry, R.A., et al., *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data*. Biostatistics., 2003 Apr. **4**(2): p. 249-64.
190. Irizarry, R.A., et al., *Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data*. Nucleic Acids Res. , 2003 Feb 15. **31**(4): p. e15.
191. Bolstad, B.M., et al., *A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias*. Bioinformatics, 2003 Jan 22. **19**(2): p. 185-93.
192. Tusher, V.G., G. Tibshirani R Fau - Chu, and G. Chu, *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2001 Apr 24. **98**(9): p. 5116-21.
193. Munder, P.G. and O. Westphal, *Antitumoral and other biomedical activities of synthetic ether lysophospholipids*. Chem Immunol, 1990. **49**: p. 206-35.
194. Gajate, C. and F. Mollinedo, *Lipid rafts, endoplasmic reticulum and mitochondria in the antitumor action of the alkylphospholipid analog edelfosine*. Anticancer Agents Med Chem, 2014. **14**(4): p. 509-27.
195. Mollinedo, F., et al., *Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH3 (Edelfosine): molecular*

- structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L)*. Cancer Res., 1997. **57**(7): p. 1320-8.
196. Mollinedo, F., et al., *ET-18-OCH₃ (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor*. Curr Med Chem, 2004. **24**: p. 3163-84.
197. Mollinedo, F., et al., *In vitro and In vivo selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts*. Clin Cancer Res. , 2010 **16**(7): p. 2046-54.
198. Mollinedo, F. and C. Gajate, *Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy*. Drug Resist Updat, 2006 **9**(1-2): p. 51-73.
199. Kepp, O., et al., *Cell death assays for drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2011 **10**(3): p. 221-37
200. Melo-Lima, S., M.C. Lopes, and F. Mollinedo, *ERK1/2 acts as a switch between necrotic and apoptotic cell death in ether phospholipid edelfosine-treated glioblastoma cells*. Pharmacol Res. , 2015. **95-96**: p. 2-11.
201. Verónica, A.P., *Actividad antitumoral el éter-lípido edelfosina en cáncer de mama*, in *Biología y clínica del cáncer*. 2015, Universidad de Salamanca.
202. De Duve C Fau - Pressman, B.C., et al., *Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue*. Biochem J, 1955 **60**(4): p. 604-17.
203. De Duve C Fau - Wattiaux, R. and R. Wattiaux, *Functions of lysosomes*. Annu Rev Physiol, 1966. **28**: p. 435-92.
204. Codogno, P. and A.J. Meijer, *Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death*. Cell Death Differ, 2005 **Suppl 2**: p. 1509-18.
205. Rodolfo, C., S. Di Bartolomeo, and F. Cecconi, *Autophagy in stem and progenitor cells*. Cell Mol Life Sci, 2015
206. Maiese, K., *Targeting molecules to medicine with mTOR, autophagy, and neurodegenerative disorders*. LID - 10.1111/bcp.12804 [doi]. Br J Clin Pharmacol. , 2015.
207. Knorr, R.L., R. Lipowsky, and R. Dimova, *Autophagosome closure requires membrane scission*. Autophagy. , 2015.
208. Mizushima, N. and T. Yoshimori, *How to interpret LC3 immunoblotting*. Autophagy. 2007 2007. **3**(6): p. 542-52.
209. Yao, N., et al., *B4G2 Induces Mitochondrial Apoptosis by the ROS-Mediated Opening of Ca²⁺-Dependent Permeability Transition Pores*. Cell Physiol Biochem, 2015. **37**(3): p. 838-52.

210. Luo, B. and A.S. Lee, *The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies*. *Oncogene.* , 2013. **32**(7): p. 805-18.
211. Groenendyk, J. and M. Michalak, *Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis*. *Acta Biochim Pol*, 2005. **52**(2): p. 381-95.
212. Shore, G.C., S.A. Papa Fr Fau - Oakes, and S.A. Oakes, *Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response*. *Curr Opin Cell Biol.* , 2011. **23**(2): p. 143-9.
213. Tabas, I. and D. Ron, *Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress*. *Nat Cell Biol.*, 2011 **13**(3): p. 184-90.
214. Breckenridge, D.G., et al., *Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol*. *J Cell Biol.*, 2003 **31**: p. 160(7).
215. Gajate, C., et al., *Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH(3)-induced apoptosis of human leukemic cells*. *Int J Cancer*, 2000 **86**(2): p. 208-18.
216. Mollinedo, F., et al., *Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria*. *Cell Death Dis*, 2011. **2**: p. e158.
217. Reis-Sobreiro, M., F. Gajate C Fau - Mollinedo, and F. Mollinedo, *Involvement of mitochondria and recruitment of Fas/CD95 signaling in lipid rafts in resveratrol-mediated antitymeloma and antileukemia actions*. *Oncogene.* , 2009. **28**(36): p. 3221-34.
218. Yadav, N. and D. Chandra, *Mitochondrial and postmitochondrial survival signaling in cancer*. *Mitochondrion*, 2014 **16**: p. 18-25.
219. Cuesta-Marban, A., et al., *Drug uptake, lipid rafts, and vesicle trafficking modulate resistance to an anticancer lysophosphatidylcholine analogue in yeast*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(12): p. 8405-18.
220. Auger, C., et al., *Dysfunctional mitochondrial bioenergetics and the pathogenesis of hepatic disorders*. *Front Cell Dev Biol*, 2015: p. 3-40.
221. Jang, S., et al., *Critical role of c-jun N-terminal protein kinase in promoting mitochondrial dysfunction and acute liver injury*. *Redox Biol*, 2015 **6**: p. 552-564.
222. Seki, E., M. Brenner Da Fau - Karin, and M. Karin, *A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches*. *Gastroenterology*, 2012 **143**(2): p. 307-20.

223. Xia, Z., et al., *Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis*. Science, 1995. **270**(5240): p. 1326-31.
224. van Blitterswijk, W.J. and M. Verheij, *Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(3)(0006-3002 (Print)): p. 663-74.
225. Bennett, B.L., et al., *SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A. , 2001. **98**(24): p. 13681-6.
226. Yiang, G.T., et al., *Acetaminophen induces JNK/p38 signaling and activates the caspase-9-3-dependent cell death pathway in human mesenchymal stem cells*. Int J Mol Med, 2015. **36**(2): p. 485-92.
227. Giuliano, M., et al., *Anandamide-induced apoptosis in Chang liver cells involves ceramide and JNK/AP-1 pathway*. Int J Mol Med, 2006 **17**(5): p. 811-9.
228. Bogoyevitch, M.A., et al., *c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges*. Biochim Biophys Acta, 2010 **1804**(3): p. 463-75.
229. Kim, M.O., et al., *Gartanin induces autophagy through JNK activation which extenuates caspase-dependent apoptosis*. Oncol Rep, 2015 **34**(1): p. 139-46.
230. Cagnol, S. and J.C. Chambard, *ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence*. FEBS, 2010. **277**(1): p. 2-21.
231. Sun, Y., et al., *Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis*. J Recept Signal Transduct Res, 2015 **35**(6): p. 600-4.
232. Cully, M., et al., *Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 2006 **6**(3): p. 184-92.
233. Hu, T.H., et al., *Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma*. Cancer, 2003 **97**(8): p. 1929-40.
234. Nakanishi, K., et al., *Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma*. Cancer, 2005. **103**(2): p. 307-12.
235. Tokunaga, E., et al., *Deregulation of the Akt pathway in human cancer*. Curr Cancer Drug Targets, 2008. **8**(1): p. 27-36.
236. Tsvetkov, A.S., et al., *A small-molecule scaffold induces autophagy in primary neurons and protects against toxicity in a Huntington disease model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010 **107**(39): p. 16982-7.

237. Thimmaiah, K.N., et al., *Identification of N10-substituted phenoxazines as potent and specific inhibitors of Akt signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(36): p. 31924-35.
238. Greijer, A.E. and E. van der Wall, *The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis*. J Clin Pathol, 2004. **57**(10): p. 1009-14.
239. Gatenby, R.A., et al., *Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1988. **14**(5): p. 831-8.
240. Schwickert, G., et al., *Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis*. Cancer Res., 1995 **55**(21): p. 4757-9.
241. Tomida, A. and T. Tsuruo, *Drug resistance mediated by cellular stress response to the microenvironment of solid tumors*. Anticancer Drug Des 1999. **14**(2): p. 169-77.
242. Fandrey, J., et al., *Cobalt chloride and desferrioxamine antagonize the inhibition of erythropoietin production by reactive oxygen species*. Kidney Int, 1997. **51**(2): p. 492-6.
243. McClintock, D.S., et al., *Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death*. Mol Cell Biol, 2002 **22**(1): p. 94-104.
244. Saikumar, P., et al., *Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury*. Oncogene, 1998. **17**(26): p. 3401-15.
245. Zhang, X., et al., *Toxic effects of microcystin-LR on the HepG2 cell line under hypoxic and normoxic conditions*. J Appl Toxicol, 2013. **33**(10): p. 1180-6.
246. Basu, S. and R. Kolesnick, *Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase*. Oncogene., 1998 **17**(25): p. 3277-85.
247. Flamant, L., et al., *Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 191.
248. Dong, Z., et al., *Apoptosis-resistance of hypoxic cells: multiple factors involved and a role for IAP-2*. Am J Pathol, 2003. **163**(2): p. 663-71.
249. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001 **414**(6859): p. 105-11.
250. Clarke, M.F. and M. Fuller, *Stem cells and cancer: two faces of eve*. Cell, 2006 **124**(6): p. 1111-5.

251. Jia, D., R.A. Dajusta D Fau - Foty, and R.A. Foty, *Tissue surface tensions guide in vitro self-assembly of rodent pancreatic islet cells*. Dev Dyn, 2007. **236**(8): p. 2039-49.
252. Foty, R.A. and M.S. Steinberg, *The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation*. Dev Biol, 2005. **278**(1): p. 255-63.
253. Duguay, D., M.S. Foty Ra Fau - Steinberg, and M.S. Steinberg, *Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants*. Dev Biol, 2003. **253**(2): p. 309-23.
254. Tong, C.M., S. Ma, and X.Y. Guan, *Biology of hepatic cancer stem cells*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26**(8): p. 1229-37.
255. Suetsugu, A., et al., *Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **351**(4): p. 820-4.
256. Kamohara, Y., et al., *The search for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma*. Surgery, 2008. **144**(2): p. 119-24.
257. Yang, Z.F., et al., *Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(2): p. 153-66.
258. Yamashita, T., et al., *EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features*. Gastroenterology, 2009. **136**(3): p. 1012-24.
259. Ma, S., et al., *Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells*. (0016-5085 (Print)).
260. Yang, Z.F., et al., *Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer*. Hepatology, 2008. **47**(3): p. 919-28.
261. Cao, L., et al., *Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines*. BMC Gastroenterol, 2011. **11**: p. 71.
262. Wang, Y.C., et al., *Drug screening identifies niclosamide as an inhibitor of breast cancer stem-like cells*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74538.
263. Haraguchi, N., et al., *Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system*. Stem Cells, 2006. **24**(3): p. 506-13.
264. Yang, J.D., et al., *Genes associated with recurrence of hepatocellular carcinoma: integrated analysis by gene expression and methylation profiling*. J Korean Med Sci, 2011. **26**(11): p. 1428-38.
265. Moreno-Navarrete, J.M., et al., *Complement factor H is expressed in adipose tissue in association with insulin resistance*. Diabetes, 2010. **59**(1): p. 200-9.

266. Linton, K.M., et al., *Acquisition of biologically relevant gene expression data by Affymetrix microarray analysis of archival formalin-fixed paraffin-embedded tumours*. Br J Cancer, 2008. **98**(8): p. 1403-14.

El llegar a la escritura de este capítulo significa haber concluido un intenso trabajo, el cuál se llevó a cabo con la contribución de muchas personas, las cuales me apoyaron durante los años que dediqué a la realización de este proyecto. Quisiera que estas palabras no sean consideradas como una simple formalidad para cubrir un requisito impuesto por la costumbre, sino un sentimiento de profundo reconocimiento a todas aquellas personas que me han ayudado y han podido hacer realidad esta tesis doctoral.

En primer lugar agradezco a mi director de tesis, al doctor Faustino Mollinedo, que me dio la oportunidad y el honor de pertenecer a su grupo de investigación, por ayudar en todas las fases de la realización de este trabajo, y sobre todo, gracias por enseñarme que la imaginación y la perseverancia son las cualidades más importantes que un científico debe desarrollar.

A la doctora Consuelo Gajate, quién participó en la fase final de este trabajo, por su disposición para discutir los resultados y su apoyo para tener siempre los materiales necesarios.

A mis compañeros, que sin ellos la tesis hubiera sido solamente una parte de mi vida, ustedes han hecho que se haya convertido en toda una aventura diaria, gracias por los debates políticos científicos y culturales; por los intercambios culinarios, por sus intentos fallidos de enseñarme a lanzar el frisbee. Cada uno ha aportado una pequeña parte a mi vida personal y profesional, y aunque ahora estén repartidos por el mundo, siempre los llevaré conmigo, donde sea que vaya.

A todo el personal de apoyo del Centro de investigación del cáncer, que siempre realizan sus labores de la mejor manera posible. Al personal de mantenimiento, Celso y Carlos, por los apaños e inventos de ingeniería. A las chicas de cocina, Ana, Rosario y Gloria, por proveernos de todos los menajes necesarios para realizar nuestras locuras experimentales. A la unidad de Microscopia, Ángel y María que siempre hacen tan agradables esas sesiones de confocal. Al almacén, Ma. Eugenia y Sonia, por ser el recurso emergente ante la falta de cualquier cosa. A los gurús de la informática Sonia y Pablo, por su disponibilidad, y ser los rescatadores de nuestros ordenadores, móviles, tablets y demás dispositivos infernales, que jamás aprenderé a reparar por mis propios medios. A la unidad de bioinformática, a Diego, por tener siempre la amabilidad de atenderme y ayudarme a resolver los entresijos de mi trabajo. A la administración por ayudar en los trámites, matriculas, contratos, proyectos, y demás cosas que los científicos no entendemos. A las amables señoras encargadas de la limpieza de nuestro centro, que sin ellas sería imposible trabajar con la comodidad de estar en un laboratorio limpio. A las personas de la conserjería, por recibirnos con una sonrisa todas las mañanas al cruzar la puerta, aunque ya no estén a Lucía y a Paco. Gracias a todos, ustedes forman parte también de éste y de todos los

trabajos que nuestro centro produce, y sin ustedes todo sería mucho más complicado.

A los integrantes del L13, que en mis inicios científicos fueron mi puerta de entrada al Centro del cáncer, en especial a Carolina, que fue quien me enseñó los fundamentos de cada cosa que he llevado a cabo hasta ahora.

A mi familia dividida en dos continentes:

En mi México lindo y querido, a mi madre muy especialmente, que ha sido la persona que más me ha impulsado desde que tengo uso de razón, gracias por estar conmigo a través de Skype cada día, estoy tan orgullosa por su valentía, su ánimo de lucha y de superación diaria, su energía y sobre todo por tener siempre las palabras exactas que me hicieron falta en cada momento de flaqueza.

A mi padre que aunque no tenga vida terrenal, sí que la tiene en mi corazón y en mis recuerdos diarios, gracias a él y a su empeño y sacrificio, me abrió las puertas a un inmenso panorama de posibilidades, y me hizo entender que siempre podía llegar más lejos, tanto que crucé el charco!, gracias papá por creer en mí y entrenarme para la batalla de la vida.

A mi hermana, mi más extenso agradecimiento por ser siempre tan amorosa conmigo, por ser una niña ejemplar, mi compañera de vida y de juegos, y que desde pequeña ya apuntaba maneras para dedicarse a la ciencia robándole los perfumes a mamá y poniéndoles plantas y cuanta cosa pudiéramos, le deseo todo el éxito del mundo en su doctorado, y no dudo que lo alcanzará.

A mi GRAN FAMILIA MEXICANA, en número de integrantes y en calidad humana; tios, primos, sobrinos, cuñados, agradezco profundamente todo el cariño que a pesar de la distancia me han demostrado, y en cada viaje me han hecho sentir que sigo siendo parte de ustedes y que la familia es lo más importante siempre, facebook y whatsapp son herramientas que me hacen sentir más cerca de ustedes y así la tristeza no es tanta cuando me pierdo de todas esas reuniones.

En España, a la familia que formé gracias a David mi marido, la persona que más veces me ha demostrado que las dificultades son solo oportunidades para fortalecernos, por ser paciente y por el toque de humor que siempre le da a todo, por estar tan bien adaptado a mi cultura y a mi manera de cocinar, y por hacerme el regalo más importante y el mejor que jamás he tenido, mi Paula.

A mi hija Paula, sin duda el ser que más quiero en este mundo, gracias por ser el punto de inflexión en mi vida, y por permitirme explotar cualidades que creía no tener, gracias por tu paciencia en todas esas tardes mientras me veías escribir esta tesis, y por las palabras que me enseñas todos los días. Me gustaría ser su ejemplo a seguir, sin embargo confío en que sobrepasará mis humildes logros.

A mis suegros que los siento y quiero como si fueran mi familia de sangre, gracias por apoyarme siempre en cuanto les ha sido posible, y por estar siempre dispuestos a ser los cuidadores de Paula, entre otras muchas cosas!.

A mis tíos políticos del País Vasco, muchas gracias por acogirme en su casa y hacerme sentir parte de la familia en todo momento, por su nobleza, su generosidad, y..... por ese carisma tan del norte pues!.

A mis amigos personales. Sarita, muchas gracias por estar tan cerca aún en la distancia, por esas tardes de seminarios intensivos de repostería, por compartir tantas aficiones conmigo, y ser cómplice de las locuras culinarias que se nos ocurrieron, agradezco profundamente tu amistad, te admiro por tu inteligencia y fortaleza, y por dar un toque personal siempre a todo cuanto haces.

A Verónica, muchísimas gracias por ser mi amiga y compañera en estos 6 años de experimentos, calamidades, chistes y demás momentazos. Siempre agradeceré tu apoyo y tus palabras de ánimo sobre todo en esta última etapa.

A Lara, mi compañera de tortura tesisista, gracias eternas siempre por ese humor catalán, por esos momentos que hemos reído a carcajadas, presas del agobio y la frustración experimental, gracias también por permitirme ser tu amiga, consejera, chofer, chef, cuidadora de peces y plantas, te quiero mucho!.

A Ximena y Diana mis colombianas favoritas, muchas gracias por abrirme las puertas de su casa y su corazón cuando lo necesité, por ser el hombro que también me dejó llorar cuando así fué necesario, por ser mis compañeras de tardes de compras, visitas al supermercado, y alguno que otro bar, etc., cada día les hecho de menos, y se que algún día volveremos a vernos.

A mi país, México. Nunca comprendí porqué existían tantas canciones de añoranza y sentimiento mexicano, y ahora que tengo tantos años viendo desde fuera el panorama que cada día nos aqueja, me doy cuenta cuanto tengo que agradecerle, y de lo importante que es amar las raíces y la tierra en la que se nace. Gracias por esta beca que me dio la oportunidad de aprender cosas nuevas, conocer gente estupenda, y llevarme la mejor experiencia de mi vida.

A todas aquellas personas que pudiera olvidar y que a lo largo de mi vida han dejado su pequeña contribución, gracias por cada lección, cada enseñanza, cada palabra, cada mirada....

Y finalmente y no por ello el menos importante, sino todo lo contrario.

A quien creó todas las cosas..., que me dio fortaleza cuando estuve a punto de caer, con toda la humildad de mi corazón, gracias Señor!.